



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**Acciones antiestrogénicas de la melatonina y cáncer
de mama**

Antiestrogenic actions of melatonin and breast cancer

Autora: Ana Berasategui Criado

Director/es: D. Samuel Cos Corral

Santander, Junio 2020

Agradecimientos:

En primer lugar, quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Samuel Cos Corral, director de este TFG, por sus orientaciones, su tiempo e implicación, incluso en las complicadas circunstancias en las que nos ha tocado trabajar.

También quiero dar las gracias a mi familia, por su incondicional apoyo y cariño a lo largo de estos seis años de carrera.

Por último, me gustaría hacer una mención especial a las grandes amistades que me ha dado la Medicina, que han sido sin duda, un pilar fundamental durante este camino, y uno de los bienes más preciados que me llevo de esta etapa tan importante en mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT	1
OBJETIVOS Y METODOLOGÍA	3
▪ Objetivos	4
▪ Metodología	4
CÁNCER DE MAMA Y ESTRÓGENOS.....	5
MELATONINA	9
▪ Síntesis, secreción, transporte y metabolismo de la melatonina	11
○ Biosíntesis	11
○ Secreción y transporte.....	12
○ Metabolismo.....	12
▪ Regulación de la síntesis de melatonina	13
▪ Mecanismo de acción	16
○ Unión a receptores de membrana	16
○ Unión a receptores nucleares	17
○ Interacción con proteínas citosólicas	18
○ Acción directa	18
○ Efectos sobre la mitocondria	18
▪ Acciones de la melatonina.....	19
○ Ritmicidad circadiana	19
○ Acciones inmunomoduladoras	20
○ Acción antioxidante y antiinflamatoria	21
○ Acción Moduladora del Eje Hipotalámico-Hipófisis-Gónadas	22
○ Acciones antitumorales	22
○ Otras acciones	24
MELATONINA, CÁNCER DE MAMA Y ESTRÓGENOS	25
▪ Regulación de la concentración plasmática de estrógenos	27
▪ Acciones moduladoras de la actividad de los receptores estrogénicos	30
▪ Acciones moduladoras de los enzimas que intervienen en la síntesis de estrógenos	35
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	44

RESUMEN / ABSTRACT

RESUMEN

La melatonina es la principal hormona secretada por la glándula pineal, siendo su función clásica la sincronización de los ritmos circadianos con la luz ambiental. Durante las últimas décadas numerosas investigaciones han descrito sus efectos oncostáticos sobre una amplia variedad de tumores, especialmente en aquellos hormono-dependientes. El objetivo del presente trabajo es describir como en el cáncer de mama, la mayoría de estas acciones oncostáticas se relacionan con sus propiedades antiestrogénicas, así como los mecanismos de acción propuestos, que incluyen: (1) regulación negativa sobre los niveles de estrógenos circulantes; (2) acción directa sobre las células tumorales mamarias, comportándose simultáneamente como modulador selectivo del receptor estrogénico (SERM) y de enzimas estrogénicas (SEEM). Otras acciones antitumorales de la melatonina relacionadas a su vez con la vía de señalización estrogénica incluyen: (3) regulación del ciclo celular; (4) inhibición de la telomerasa; (5) inhibición de metástasis tumorales; (6) acción antioxidante; (7) acción antiangiogénica; (8) acción inmunomoduladora. Estas propiedades hacen de la melatonina una hormona con potencial preventivo y terapéutico en el cáncer de mama hormono-dependiente, siendo necesarios estudios adicionales para definir con mayor precisión el papel de esta hormona en la aplicación clínica oncológica.

Palabras Clave: Melatonina, cáncer de mama, estrógenos, antiestrógenos.

ABSTRACT

Melatonin is the main hormone secreted by the pineal gland, and the synchronization of circadian rhythms with daylight, has been considered its classic function. During the last decades, numerous investigations have described its oncostatic effects on a wide variety of tumors, especially those that are hormone-dependent. The objective of the present work is to describe how, in breast cancer, most of these oncostatic actions are related to its antiestrogenic properties; as well as the proposed mechanisms of action, which include: (1) negative regulation on circulating estrogen levels; (2) direct action on mammary tumor cells, acting simultaneously as a selective modulator of the estrogenic receptor (SERM) and of estrogenic enzymes (SEEM). Other melatonin anti-tumor actions related in turn to the estrogen signaling pathway include: (3) cell cycle regulation; (4) inhibition of telomerase; (5) inhibition of tumor metastases; (6) antioxidant action; (7) antiangiogenic action; (8) immunomodulatory action. These properties make melatonin a hormone with preventive and therapeutic potential in hormone-dependent breast cancer, and additional studies are necessary to define more precisely the role of this hormone in clinical oncological application.

Key Words: Melatonin, breast cancer, estrogens, antiestrogens.

OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

Objetivos

El objetivo fundamental del presente trabajo es describir como las acciones antiestrogénicas juegan un papel destacado dentro de los efectos oncostáticos de la melatonina pineal, centrándonos en aquellas acciones antitumorales de la melatonina que están relacionadas con la vía de señalización estrogénica. Para ello, en primer lugar, realizaremos una breve introducción sobre el papel de los estrógenos en la carcinogénesis mamaria, así como una revisión de la fisiología de la glándula pineal y de su principal producto de secreción, la melatonina.

A continuación, realizaremos una revisión actualizada de la literatura, con el objetivo de describir los principales mecanismos de acción de la melatonina y analizar las diferentes funciones que se le han asignado.

Finalmente, nos centraremos en la potencial implicación de las acciones antiestrogénicas de la melatonina en la prevención y el desarrollo del cáncer de mama hormono-dependiente.

Metodología

Para el desarrollo del trabajo hemos realizado una revisión actualizada de la literatura, utilizando diferentes bases de datos (PubMed, Medline, etc.), artículos publicados en revistas científicas de alto impacto, como *Journal of Pineal Research*, *Cancer Research*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, *Journal of Neuroendocrinology*, o *Pharmacological Reviews*, así como libros y fuentes de soporte digital.

Para realizar la búsqueda bibliográfica se han empleado las palabras clave: melatonina, cáncer de mama, estrógenos, glándula pineal, vías de señalización estrogénica.

CÁNCER DE MAMA Y ESTRÓGENOS

El cáncer de mama se define como una proliferación maligna y descontrolada de células epiteliales mamarias que han adquirido propiedades que les permiten evadir la muerte celular, invadir tejidos circundantes y, en algunos casos, metastatizar a otros lugares a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo. El crecimiento celular y la integridad genómica están estrechamente regulados en las células normales por distintos genes. Sin embargo, en las células tumorales a menudo se pierde esta regulación debido a las anomalías (hereditarias o adquiridas) en dichos genes, como por ejemplo los genes supresores de tumores y oncogenes.

A nivel mundial, el cáncer de mama es la segunda neoplasia maligna más frecuente, después del cáncer de pulmón, con una incidencia anual estimada de más de dos millones de casos al año y en aumento. En el sexo femenino, constituye la primera neoplasia en incidencia, llegando a suponer hasta el 24,2% de las neoplasias diagnosticadas en la mujer en el año 2018. Sin embargo, las tasas de mortalidad por cáncer de mama han sufrido un descenso significativo desde la década de 1970, gracias a la mejora en las técnicas de detección precoz, que siguen siendo la piedra angular, y en la terapia adyuvante. Actualmente representa la quinta causa de muerte por cáncer, siendo la primera en el sexo femenino, ocasionando más de 600.000 fallecimientos al año [1,2].

Los estrógenos juegan un papel esencial en el crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria, estimulando además el desarrollo mamario durante la pubertad y la maduración sexual, por mediación del 17β -estradiol, que es el principal esteroide ovárico circulante y la hormona biológicamente más activa a nivel tisular mamario [3]. Sin embargo, existe evidencia científica de la implicación de éstos en la carcinogénesis mamaria, ejerciendo un papel fundamental en la génesis y progresión tumoral, yendo a favor de esta teoría, el hecho de que el cáncer de mama es el clásico ejemplo de tumor maligno hormono-dependiente, siendo inicialmente de este tipo más del 95% de los casos, tanto aquellos presentes en la pre- como postmenopausia.

La primera referencia a la acción de los estrógenos en la carcinogénesis a nivel mamario, data del año 1986, cuando Beatson, cirujano del Glasgow Cancer Hospital y pionero en el uso de la terapia hormonal para el manejo del cáncer de mama avanzado, observó una respuesta de regresión tumoral en pacientes con cáncer de mama avanzado y metastásico tras ser sometidas a una salpingooforectomía bilateral [4]. A raíz de estos hallazgos, un gran número de ensayos clínicos han subrayado la importancia de la esteroideogénesis ovárica en la génesis del cáncer de mama, vinculando la exposición acumulativa y sostenida a estos con un mayor riesgo de desarrollar este tipo de tumores [3]. Esto ha supuesto que muchos factores tales como la menarquía temprana, menopausia tardía, nuliparidad, obesidad y el tratamiento hormonal sustitutivo sean considerados de riesgo, predisponiendo al cáncer de mama dado el “hiperestrogenismo” que inducen [5].

En la actualidad aún no están claros cuales son los mecanismos de acción implicados en la carcinogénesis mamaria inducida por los estrógenos, existiendo controversia con relación a si dichos efectos son ejercidos por mecanismos directos o indirectos. La mayoría de las hipótesis van a favor de un efecto carcinógeno indirecto relacionado con la acción estimuladora de los estrógenos sobre la proliferación celular epitelial, mediada

por su unión al ER α , debido a la posibilidad de errores en la replicación del ADN que resultarían en mutaciones puntuales. Otras teorías, lo relacionan con el efecto carcinógeno directo ejercido por los radicales libres generados en la oxidación del 17 β -estradiol y sus metabolitos, que podrían actuar como potenciales agentes mutagénicos responsables de daño oxidativo a nivel del ADN [3,6].

Otro aspecto que secunda el papel de los estrógenos en la génesis y crecimiento de tumores de mamaros es el hecho de que 2/3 de los cánceres de mama se presentan en mujeres postmenopáusicas, es decir, una vez que los ovarios han perdido su funcionalidad y los niveles de estrógenos circulantes son bajos. Mientras que, en mujeres premenopáusicas, el 70% de los estrógenos procede de los ovarios y el 30% restante deriva de la conversión de andrógenos a nivel periférico (principalmente dehidroepiandrosterona y su sulfato). Una vez se ha producido el cese de la función folicular ligado a la menopausia, la mayor parte de la esteroidogénesis tiene lugar en los tejidos periféricos (células mesenquimales del tejido adiposo y la piel, osteoblastos, condrocitos, endotelio vascular, músculo liso de la aorta y diferentes áreas del cerebro como el hipotálamo y amígdalas), a partir de precursores suprarrenales, siendo la vía de la aromatasa uno de los principales sistemas enzimáticos involucrados en el proceso, excepto por una pequeña contribución de testosterona y androstenediona ovárica y/o suprarrenal [5,3]. En este contexto, a pesar de que los niveles plasmáticos de estrógenos son reducidos, la concentración de estradiol en tejidos periféricos, como la glándula mamaria, es alta como resultado de la biosíntesis *in situ*, que además predomina sobre su absorción plasmática, favoreciendo el mantenimiento de altas concentraciones de estradiol en el tejido mamario postmenopáusico [7].

El tejido tumoral mamario dependiente de estrógenos ha sido denominado tejido "intracrino", dado que la conversión *in situ* de andrógenos séricos a estrógenos biológicamente activos se produce sin liberación al espacio extracelular. Además, contiene todas las enzimas implicadas en este proceso, estando dos vías enzimáticas principales involucradas en las fases finales de la formación de estrógenos: la vía de la aromatasa, que cataliza la conversión de androstenediona en estrona, y la vía de la sulfatasa, que hidroliza los sulfatos de estrona en estrona. La estrona se convierte posteriormente en 17 β -estradiol por la 17-HSD1 [3].

- En el tejido normal, la actividad de la 17 β -HSD tipo 2 (17 β -HSD2), que convierte el 17 β -estradiol en estrona, y la estrógeno sulfotransferasa (EST), que inactiva la estrona y el 17 β -estradiol, son altos y protegen de los efectos estrogénicos excesivos.
- En el tejido del carcinoma de mama, la sulfatasa, la aromatasa y la 17 β -HSD1 tienden a sobreexpresarse, mientras que la EST y la 17 β -HSD2 se reducen con frecuencia, lo que puede provocar la acumulación de 17 β -estradiol activo.

En resumen, en el tejido mamario sano, los principales precursores de la producción local de estrógenos son los esteroides inactivos circulantes, la androstenediona y los sulfatos de estrona, desplazándose la reacción enzimática hacia la producción de estrona de baja actividad, a diferencia del tejido de adenocarcinoma de mama, donde predomina la formación del 17 β -estradiol activo.

Debido, por tanto, al papel que ejercen los estrógenos como carcinógenos mamarios, uno de los principales objetivos del tratamiento del cáncer de mama siempre ha sido neutralizar dichos efectos de los estrógenos sobre la mama, siendo la ovariectomía, como ya se ha mencionado previamente, la primera terapia “antiestrogénica”. Desde entonces, el tratamiento del cáncer de mama ha incluido terapia local de la región mamaria afectada (cirugía y radioterapia) y terapia general incluyendo quimioterapia y hormonoterapia. Las estrategias farmacológicas empleadas para neutralizar selectivamente los efectos de los estrógenos a nivel mamario incluyen [5]:

- **Fármacos capaces de modular la actividad del receptor de estrógenos (*Selective Estrogen Receptor Modulators, SERM*).** En este grupo se incluyen el tamoxifeno y sus derivados, habiendo demostrado un efecto beneficioso en la reducción de la morbilidad asociada al cáncer de mama. Tras haberse producido la identificación y caracterización de dos ER (α y β), los SERM óptimos serían aquellos que bloquean selectivamente el ER α , pero no el ER β .
- **Fármacos que interfieren con la síntesis de hormonas esteroideas, mediante la inhibición de los enzimas implicados en la conversión de andrógenos a estrógenos desde precursores androgénico (*Selective Estrogen Enzyme Modulators, SEEM*).** Este grupo incluye compuestos esteroideos (formestano, exemestano, etc.) y no esteroideos (anastrozol, letrozol, etc.).

Volviendo a los mecanismos de acción de los estrógenos a nivel tumoral mamario, los SERM, al bloquear la respuesta a los estrógenos a nivel del RE, previenen sus efectos carcinogénicos indirectos derivados de la mencionada capacidad para aumentar la proliferación celular a través de la activación del ER α . Los SEEM, al disminuir la síntesis endógena de estrógenos, no solo previenen los efectos derivados de su unión a los ER, sino también las posibles acciones mutagénicas directas de los esteroides o de sus metabolitos.

Datos recientes, obtenidos a partir de ensayos con pacientes con cáncer de mama, han sugerido que la utilización de agentes selectivos para regular otras enzimas involucradas en la biosíntesis y transformación de estrógenos (estrógeno sulfotransferasas, sulfatasas y 17 β -HSD1), en combinación, con la acción antiaromatasa también pueden ejercer un potencial terapéutico importante como terapia endocrina para el bloqueo total de los estrógenos locales en el cáncer de mama, proporcionando con ello, nuevas posibilidades en el tratamiento de esta enfermedad.

El objetivo de este trabajo es describir que, entre las múltiples acciones de la melatonina, hay una muy importante que es su comportamiento como agente oncostático, en particular, en los tumores estrógeno-dependientes, como es el caso del cáncer de mama, siendo esta acción antitumoral de la melatonina, en gran parte, de características antiestrogénicas, incluyendo tanto las acciones sobre el eje hipotálamo-hipófisis (disminución de GnRH y gonadotropinas), como las propiedades que comparte la melatonina con los dos grupos principales de fármacos empleados en el tratamiento hormonal del cáncer, comportándose simultáneamente como SERM y SEEM.

MELATONINA

Historia

Hace 50 años, Lerner y sus colaboradores aislaron la melatonina, principal sustancia biológicamente activa secretada por la glándula pineal, órgano considerado hasta ese momento por muchos científicos como un órgano vestigial, hasta el aislamiento en el año 1958 de la N-acetil-5-metoxitriptamina, más conocida como melatonina. Sin embargo, la primera descripción de esta glándula data en el siglo III a. C por Herófilo de Calcedonia, siendo Galeno, en el siglo II a. C, el primero en proporcionar una descripción de su anatomía y en asignarle el nombre por la que hoy la conocemos, *konarium* (cono de piña), acepción que ha perdurado hasta la actualidad en su traducción latina (*pineal*), ya que es la morfología que adopta en los seres humanos.

Anatomía funcional

La glándula pineal o epífisis de los mamíferos es un órgano endocrino localizado en el cerebro, cuya propiedad principal es actuar como un transductor neuroendocrino, integrando señales neurales procedentes de la retina, dependientes de la duración e intensidad de la iluminación ambiental y, liberando a la circulación, en respuesta a ellas, señales hormonales encargadas de transmitir información al organismo sobre la duración del ciclo luz/oscuridad, permitiendo con ello la sincronización de un gran número de ritmos circadianos, implicados en la fisiología de todas las especies, y diana de posibles nuevas perspectivas terapéuticas en relación con trastornos cronobiológicos y en el control de cánceres hormono-dependientes, como el de mama [8].

Embriológicamente, la glándula pineal es una estructura encefálica que se origina a partir de una evaginación neuroepitelial del techo del diencéfalo, que en el ser humano se hace evidente durante el segundo mes de vida intrauterina, adquiriendo una morfología cónica y siendo su peso en el adulto torno a 100-200 mg.

Anatómicamente, se ubica en el borde posteroinferior del cuerpo calloso, entre ambos tubérculos cuadrigéminos superiores y en comunicación con el tercer ventrículo, aunque se dispone fuera de la barrera hematoencefálica. Se encuentra rodeada por piamadre, la cual forma una cápsula desde la que se proyectan tabiques por los cuales ingresan gran cantidad de vasos sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y estroma conjuntivo, siendo el flujo sanguíneo pineal el segundo en importancia del organismo, después del renal, constituyendo esta una prueba en contra de la naturaleza vestigial con la que ha sido etiquetada durante años [8].

A nivel histológico, los pinealocitos constituyen el 80% del componente celular de la epífisis en los mamíferos, estando constituida el 15% de la celularidad restante por elementos vasculares, terminaciones nerviosas y células de la glía [8].

En cuanto a la innervación de la epífisis, en la mayoría de las especies, incluidos mamíferos, es predominantemente simpática noradrenérgica, siendo las únicas aferencias fibras postganglionares perivasculares originadas en los ganglios cervicales superiores (GCS) (Fig. 1). A su vez la pineal posee también una innervación de origen central, ya que las neuronas preganglionares que hacen sinapsis en el núcleo simpático medular reciben impulsos descendentes procedentes del núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Finalmente, ha sido descrita además una escasa innervación parasimpática, y más recientemente una innervación de tipo peptidérgico la cual estaría involucrada en el control de la secreción glandular [8, 9].

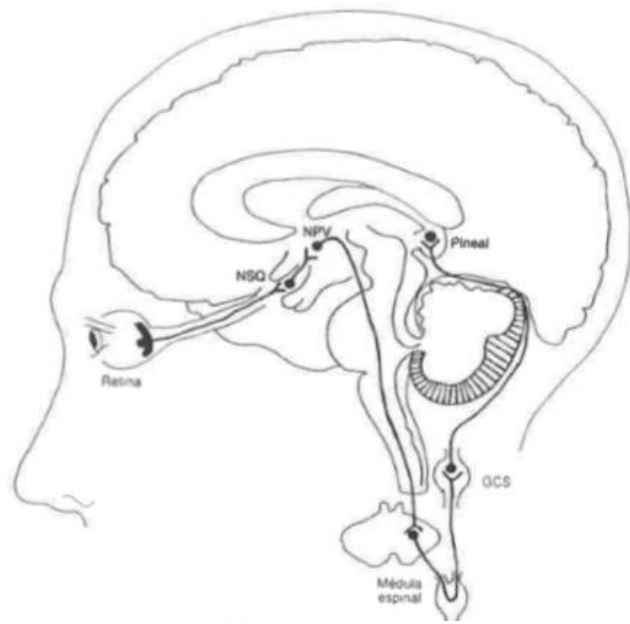


Figura 1. Localización de la glándula pineal en el encéfalo humano y vía de transmisión de la información luminosa. NSQ: Núcleos supraquiasmáticos; NPV: Núcleo paraventricular; GCS: Ganglio cervical superior (Cardinali et al. 1994) [8].

Desde el punto de vista fisiológico, juega un importante papel endocrino, siendo responsable de coordinar los ritmos circadianos a través de la producción de melatonina. Además, presenta importantes efectos oncostáticos, geroprotectores y antioxidantes.

1. Síntesis, secreción, transporte y metabolismo de la melatonina

1.1. Biosíntesis

En la glándula pineal de los mamíferos ha sido descrita la presencia de numerosas sustancias de naturaleza peptídica, tales como: vasopresina, arginina-vasotocina, oxitocina y neurofisinas, entre otras. Sin embargo, la síntesis pineal de indolaminas a partir del triptófano ha sido estudiada en profundidad y actualmente es considerada la función primaria de la glándula, constituyendo la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) su principal componente de secreción [8].

La síntesis de melatonina se inicia con la captación de triptófano por los pinealocitos, probablemente mediante un mecanismo de transporte activo que se encuentra bajo control adrenérgico [10]. Una parte del triptófano es utilizado para la producción de proteínas, mientras que la fracción cuantitativamente mayor es convertida a indolaminas [8]. El proceso continúa con 4 reacciones enzimáticas (Fig. 2):

En primer lugar, el triptófano es convertido en 5-hidroxitriptófano y serotonina, por la acción sucesiva de las enzimas triptófano hidroxilasa y descarboxilasa de aminoácidos aromáticos.

La serotonina es la precursora del compuesto biológicamente activo (melatonina), siendo sus concentraciones pineales las más elevadas de todo el organismo. La vía endocrina específica y prioritaria del metabolismo de serotonina intrapineal es su conversión a melatonina, la cual comprende dos reacciones enzimáticas [8, 11].

- En primer lugar, la serotonina es acetilada a N-acetilserotonina, precursor directo de la melatonina, por la acción de la enzima serotonina-N-acetiltransferasa (SNAT), siendo la SNAT el factor limitante en la biosíntesis de melatonina [3].
- En segundo lugar, otra enzima, la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), transfiere el grupo metilo donado por la S-adenosilmetionina a la posición 5-hidroxil de la N-acetilserotonina, dando como resultado melatonina [8]. Estudios recientes apuntan a la HIOMT como verdadera enzima limitante [12].

La síntesis de la melatonina no es exclusiva de la pineal, también tiene lugar en otros tejidos (retina, tracto gastrointestinal, piel o médula ósea) en los que se ha descrito la presencia de la enzima HIOMT, aunque su contribución a los niveles plasmáticos de melatonina es baja. La cantidad de melatonina producida a este nivel es mucho mayor que en la pineal, aunque permanece en el interior celular, ejerciendo una acción exclusivamente local protegiendo a las células del daño oxidativo, dado que la producción de ROS (reactive oxygen species) y RNS (reactive nitrogen species) tiene lugar durante las fases de actividad metabólica, no coincidiendo este periodo con el pico de melatonina pineal [8].

1.2. Secreción y transporte

La melatonina es secretada al torrente sanguíneo por un mecanismo de difusión simple, penetrando en diversos compartimentos corporales, como el líquido amniótico y LCR. Circula en plasma unida en un 80% a la albumina y el resto en forma libre. Debido a que la melatonina no se acumula en la glándula pineal, los niveles de la hormona en sangre son considerados el principal índice de su síntesis pineal [8].

1.3. Metabolismo

El nivel de melatonina en sangre está regulado por el equilibrio entre su síntesis en la glándula pineal (en respuesta a los ciclos luz/oscuridad) y su degradación periférica, fundamentalmente en el hígado [13]. La degradación de melatonina se realiza por tres mecanismos [14] (Fig. 2).

- **Metabolismo hepático (85-95%):** La mayor parte de la melatonina circulante es metabolizada en el hígado a través de un proceso de hidroxilación para formar un compuesto inactivo, la 6-hidroximelatonina, que luego se conjuga con ácido sulfúrico (70-80%) o glucurónico (5-30%), formas de excreción en orina y heces principalmente. Las concentraciones de 6-hidroximelatonina plasmática y de su principal metabolito urinario la 6-sulfatoximelatonina, son representativas de la

producción diaria de la hormona, así como de la magnitud de su pico nocturno [8].

- **SNC y otros tejidos periféricos (retina, piel) (5%):**
 - Vía indólica: 5-metoxindolacético o 5-metoxitriptofol.
 - Vía kinúrica: formación de N-formil-5-metoxiquinurenamina (AFMK) y N-acetil-5-metoxiquinurenamina (AMK), compuestos de acción biológica comprobada. Estos metabolitos tienen una participación muy importante en la cascada antioxidante de la melatonina [15].

Finalmente, una pequeña proporción de la melatonina circulante es eliminada en la **orina de forma libre** [8].

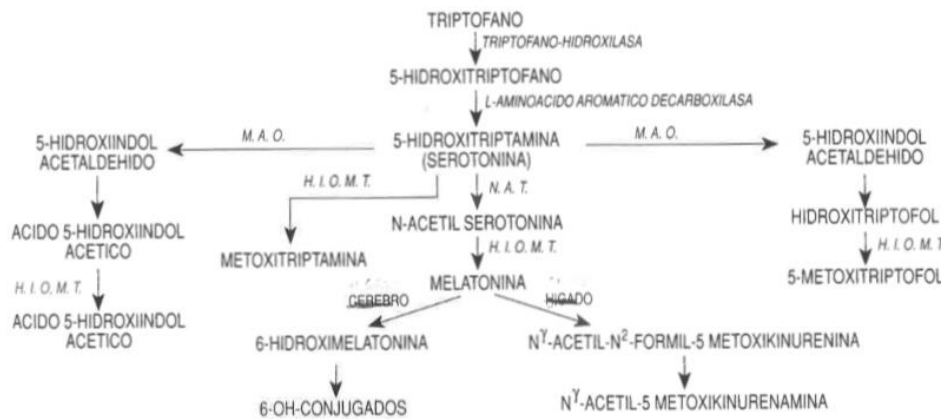


Figura 2. Vía de síntesis y metabolización de la melatonina. HIOMT: Hidroxindol-O-metiltransferasa; N.A.T: Serotonina N-acetiltransferasa; M.A.O: Monoamino oxidasa (Cardinali et al. 1994) [8].

2. Regulación de la síntesis de melatonina

La característica más relevante de la secreción de melatonina pineal es que presenta un patrón circadiano, estando su ritmo de síntesis bajo regulación del ciclo luz/oscuridad, siendo sus niveles circulantes bajos durante el día (10-20 pg/ml) y mostrando un importante incremento durante la noche (80-120 pg/ml) [16].

También hay que destacar que existen diferentes patrones de secreción de melatonina. El humano tiene un patrón de secreción de tipo II, lo que implica que los niveles de melatonina comienzan a aumentar gradualmente a partir del momento de la transición luz/oscuridad para alcanzar su valor máximo hacia la mitad del periodo de oscuridad, produciéndose, por tanto, el pico de secreción de melatonina entre las 2 y las 6 de la mañana [8] (Fig. 3).

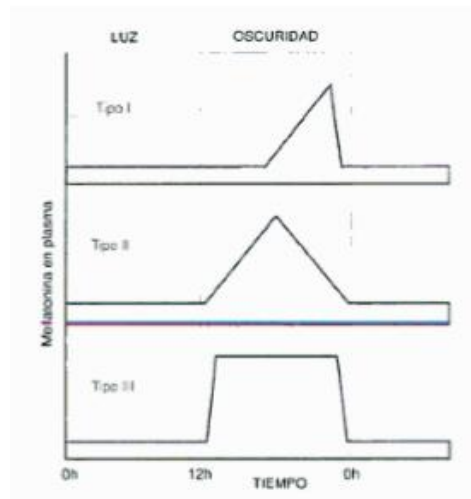


Figura 3. Patrones de secreción de la melatonina (Cardinali et al. 1994) [8].

Al determinar a lo largo de un ciclo diario, de forma periódica, las concentraciones pineales de melatonina y de sus precursores, o la actividad de las enzimas SNAT y HIOMT, comprobaremos en todos ellos la existencia de un ritmo dependiente de la alternancia luz/oscuridad. Un hecho relevante es que las propias enzimas son capaces de responder a cambios en la luz ambiental, con actividades altas durante la oscuridad y bajas durante el día, en todas las especies estudiadas, incluido el hombre [8].

La actividad biosintética y secretora de la glándula pineal responde primariamente a estímulos lumínicos (regulación de tipo neural) y secundariamente a estímulos hormonales provenientes de los tejidos periféricos (regulación de tipo hormonal), de ahí que a la glándula pineal se la defina como un transductor neuroendocrino [8].

En los mamíferos, este primer circuito está constituido por varios elementos (Fig. 4):

- Retina y tracto retinohipotalámico.
- Núcleos supraquiasmáticos (NSQ).
- Ganglio Cervical superior (GCS).
- Glándula pineal.

La información fotosensorial es captada por los fotorreceptores de la retina que a través del tracto retinohipotalámico, transmiten potenciales de acción a los núcleos supraquiasmáticos. Desde los núcleos supraquiasmáticos, la información llega a través de una vía multisináptica, a la columna intermediolateral de la medula

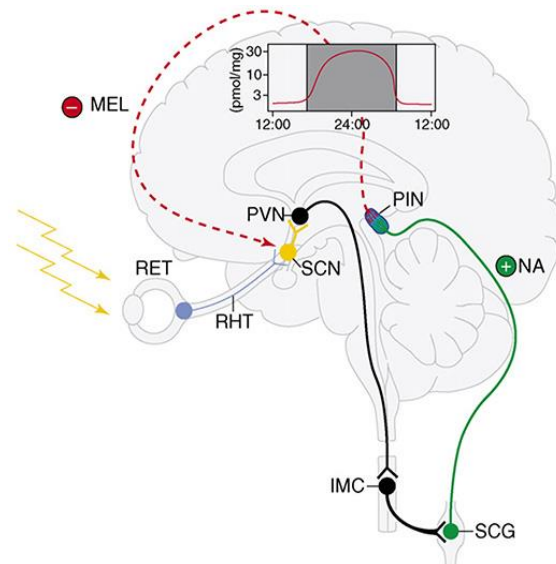


Figura 4. Esquema de la vía polisináptica que controla la producción de melatonina por la glándula pineal. MEL: melatonina; RET: retina; RHT: tracto retinohipotalámico; SCN: núcleo supraquiasmático; PVN: núcleo paraventricular; IMC: columna intermediolateral de la médula cervical; SCG: ganglio cervical superior; NA: noradrenalina; PIN: pineal. (Acuña-Castroviejo y Escames 2017) [17].

espinal, donde se originan las conexiones preganglionares que hacen escala en los GCS. Desde este punto, se envían eferencias postganglionares simpáticas noradrenérgicas, que van a ser las encargadas de inervar la glándula pineal (Fig. 4). El esquema clásico de la regulación pineal defiende que la luz mantiene inhibida la actividad eléctrica de las neuronas ganglionares, mientras que la interrupción del estímulo lumínico produce una inmediata activación neuronal, con liberación de noradrenalina en las fibras simpáticas postganglionares. La norepinefrina interactúa con receptores α_1 y β_1 -adrenérgicos en la membrana del pinealocito, desencadenando una cascada de señalización intracelular [11] (Fig. 5):

- La NA cuando interactúa con los receptores β , activa la adenilato ciclasa (AC), vía proteína G estimuladora (GS). La AC produce AMPc a partir de ATP. El aumento de AMPc promueve la activación de una quinasa la cual activa a numerosas enzimas, entre ellas la SNAT.
- Al interactuar también con los receptores α_1 , estos estimulan la cascada de los fosfatidilinositoles, vía proteína G, aumentando el Ca^{2+} libre citosólico y activando la proteína quinasa (PKC). Esta proteína estimula la AC, con lo que aumenta la concentración de AMPc, y se activa la enzima SNAT, lo que conlleva a la síntesis de melatonina. La interacción de NA con los receptores α_1 -adrenérgicos potencia el efecto de los receptores β .

Este esquema de regulación pineal ha sido recientemente ampliado a un modelo más complejo, que implica un control multifactorial de la secreción de melatonina incluyendo la existencia de una inervación pineal central que contribuye al control secretorio de la glándula, con implicación de terminaciones peptidérgicas, colinérgicas y aminoacidérgicas; así como la existencia de un control paracrino de la actividad pineal, siendo un ejemplo de esta señal paracrina el sistema gabaérgico [8].

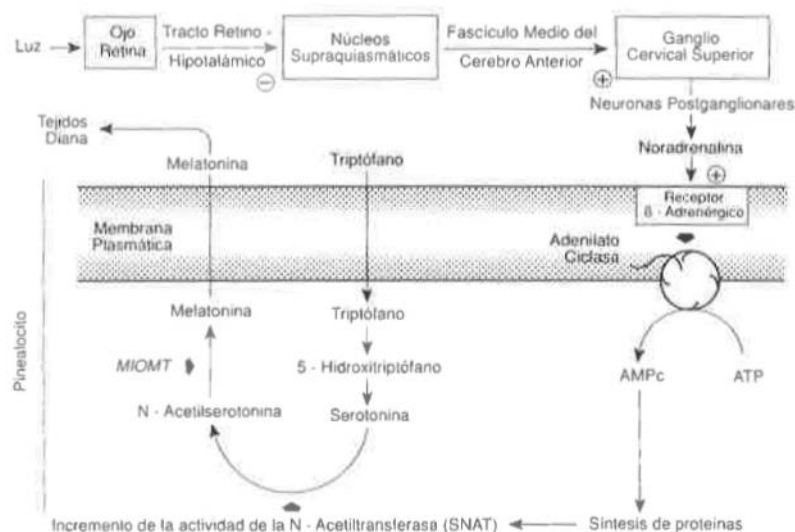


Figura 5. Vía a través de la cual la información luminosa regula la síntesis de melatonina en la glándula pineal (Cardinali et al. 1994) [8].

La glándula pineal presenta también retroalimentación hormonal por los distintos órganos efectores sobre los que actúa, habiéndose evidenciado una alteración en la

producción de melatonina tras la ablación de algunos órganos glandulares endocrinos y en otras situaciones como estrés o embarazo. Entre las hormonas capaces de actuar sobre la pineal tanto de forma directa (por interacción con receptores específicos en el pinealocito) como indirecta, se incluyen: estrógenos, andrógenos, prostágenos, corticoides, tiroxina, gonadotropinas, prolactina, entre otras. Este control hormonal explica las variaciones que tienen lugar en el ritmo de secreción de melatonina a lo largo del ciclo reproductivo, que no serían más que respuestas a cambios en las concentraciones de gonadotrofinas y esteroides ováricos. [8].

En definitiva, la modulación hormonal complementa a la neural, ya que los efectos inducidos por el ambiente hormonal en la actividad pineal se superponen con los cambios circadianos dependientes del ciclo luz-oscuridad.

3. Mecanismo de acción

El descubrimiento en los últimos años de diferentes dianas celulares sugiere una variedad de mecanismos de acción para la melatonina. En la actualidad han sido descritos cinco mecanismos a través de los cuales actúa [9, 10, 18] (Fig. 6):

- Unión a receptores de membrana.
- Unión a receptores nucleares.
- Mecanismos de acción independientes de la unión a receptores: interacción con proteínas citosólicas, interacción con la mitocondria y acción directa.

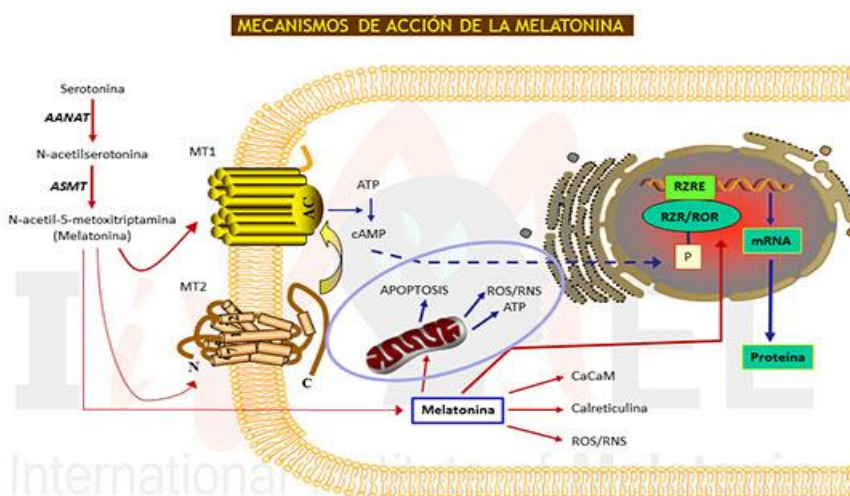


Figura 6. Mecanismos de acción de la melatonina. Esta hormona ejerce sus funciones a través de receptores de membrana (MT₁ y MT₂); receptores nucleares (ROR); uniéndose a proteínas reguladoras del calcio (calmodulina y calreticulina), y manteniendo la homeostasis mitocondrial (Acuña-Castroviejo y Escames 2017) [25].

3.1. Unión a receptores de membrana

La melatonina ejerce sus principales acciones biológicas a través de su unión a receptores específicos en los tejidos diana. Gracias a la introducción del compuesto 2-[¹²⁵I]-iodo-melatonina como marcador de sitios de unión de melatonina se identificaron dos receptores de melatonina, MT₁ y MT₂, con diferente afinidad (MT₁ en el rango picomolar y MT₂ rango nanomolar) y localización en SNC y numerosos tejidos

periféricos. Son receptores de membrana acoplados a proteínas G, fundamentalmente proteínas G inhibidoras, a través de los cuales la melatonina modula una amplia variedad de segundos mensajeros, principalmente AMPc, habiéndose descrito efectos sobre otros segundos mensajeros como calcio, GMPc, diacilglicerol o proteína quinasa C dependiendo del tipo celular estudiado [8,10].

En relación con su localización, ambos receptores se expresan en una amplia variedad de tejidos, el subtipo MT₁ se ha identificado en la *pars tuberalis* de la hipófisis y en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo y área postrema, predomina durante las horas de la mañana, y parece estar implicado en el efecto inhibitorio que la melatonina ejerce sobre la liberación de dopamina, regulando los ritmos circadianos a nivel del NSQ, así como en la secreción de prolactina. Por su parte, el subtipo MT₂ se encuentra principalmente en la retina y alcanza su máxima expresión en las últimas horas de luz, momento de mayor sensibilidad del eje neuroendocrino para los efectos de la melatonina [8].

También se ha descrito un tercer subtipo, el MT₃ con baja afinidad por la 2-[¹²⁵I]-iodo-melatonina, no unido a proteínas G, y que no se ha identificado en humanos. Presenta un 95% de homología con la quinona reductasa 2; es por ello que uno de los mecanismos de acción de la melatonina podría consistir en su interacción con esta enzima, asociada con la respuesta inflamatoria y la regulación de la presión intraocular [19].

La expresión de estos receptores varía en función de varios factores, como la especie, tejido, luz ambiental, estado endocrino y el estado de desarrollo del individuo [10]. Como conclusión de estos estudios fue propuesta la clasificación de los sitios de unión de melatonina descritos en la tabla I [8].

	MT ₁	MT ₂	MT ₃
Localización	NSQ, pars tuberalis, retina	Hipotálamo, corteza cerebral, cerebelo, hipocampo.	Glándula pineal
Especificidad	Melatonina > 6-OH-melatonina >> N-acetilserotonina	Melatonina > N-acetilserotonina >> 6-OH-melatonina > serotonina	Melatonina >> N-acetilserotonina, serotonina >> 6-OH-melatonina
Mecanismo intracelular	Proteína G (Gi, G0). Inhibición de adenilato ciclasa	Ca ²⁺ , GMPc, AMPc, prostaglandinas	PI turnover (Gq/11)

Tabla I. Receptores de melatonina en el SNC: tipos, mecanismo intracelular, localización, especificidad (Cardinali et al. 1994) [8].

3.2. Unión a receptores nucleares

En base a la naturaleza lipofílica de la melatonina, y su escasa dificultad para atravesar las membranas citoplasmática y nuclear, algunos estudios han descrito su unión a

receptores nucleares pertenecientes a la subfamilia de los receptores del retinoide Z (orphan receptors, receptores huérfanos nucleares) [8].

Los RORs/RZS son receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción intranucleares. Se ha sugerido que la melatonina parece ser el ligando natural de estos receptores, ejerciendo funciones de inmunomodulación a través de la 5-lipooxigenasa [10]. Sin embargo, esta hipótesis todavía no está suficientemente demostrada [20].

3.3. Interacción con proteínas citosólicas

También se han propuesto mecanismos alternativos de acción de la melatonina, no mediados por receptores. La melatonina puede actuar a nivel intracelular, uniéndose a la calmodulina citosólica y, por lo tanto, afectando a la señalización del calcio y modulando las proteínas estructurales del citoesqueleto [8, 21, 22]. También se ha descrito su interacción con otras proteínas citosólicas como la calreticulina, tubulina y proteína quinasa C [23,24]. Todas estas proteínas participan en el metabolismo del calcio y en la modulación de la estructura del citoesqueleto, además, la interacción calreticulina-calmodulina se asocia a la regulación de la acción de diferentes hormonas en el núcleo celular [23].

3.4. Acción directa

En cuanto a las acciones de la melatonina independientes de los receptores, éstas incluyen sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias [25]. Existe una gran evidencia científica que avala la eficacia de la melatonina actuando como un potente antioxidante depurando diferentes especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, protegiendo así a las células contra el daño oxidativo [10, 21].

Estos efectos que se comentarán con mayor detalle en el apartado “Acciones de la melatonina” se ejercen de tres maneras: (a) La melatonina tiene actividad de “scavenger” o neutralizadora de radicales libres. (b) La melatonina se metaboliza a otros compuestos de gran actividad antioxidante. (c) La melatonina también es un antioxidante indirecto, estimulando la síntesis de enzimas antioxidantes e inhibiendo la de enzimas prooxidantes [19].

3.5. Efectos sobre la mitocondria

Se han identificado dos sitios de unión específicos de la melatonina a la mitocondria, uno de alta y otro de baja afinidad. A través de esta unión la melatonina participa en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial [10]. Se han propuesto las siguientes acciones (Fig. 7): aumento de la función mitocondrial, reducción de radicales libres, aumento de ATP, neutralización de la apoptosis en células normales [25,26].

Existe además un efecto antiapoptótico y citoprotector de la melatonina ejercido en condiciones de isquemia (no relacionado con radicales libres) y atribuibles a una actividad estabilizadora de la membrana mitocondrial [19].

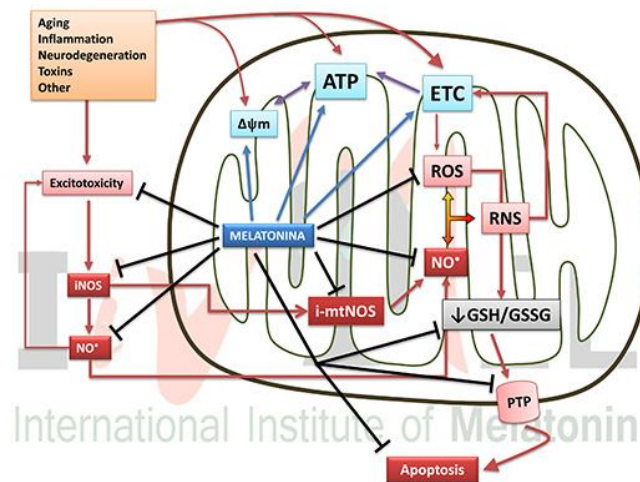


Figura 7. Mecanismo de acción de la melatonina en la mitocondria. La melatonina ejerce una serie de funciones que van dirigidas hacia la protección de esta organela frente al daño oxidativo/inflamatorio. El resultado es un aumento de la función mitocondrial, reducción de los radicales libres, aumento del ATP, y neutralización de la apoptosis en células normales (Acuña-Castroviejo y Escames 2017) [25].

4. Acciones de la melatonina

Se han atribuido diferentes acciones fisiológicas a la melatonina en gran variedad de contextos biológicos. En general, las acciones de la melatonina se pueden dividir en cinco grandes grupos.

Por un lado, la glándula pineal a través de la melatonina es el nexo indispensable para la sincronización de diferentes ritmos circadianos y circanuales con la luz ambiental, de esta forma la melatonina media el control fotoperiódico de los ritmos reproductores en los mamíferos con apareamiento estacional y los ritmos termorregulatorios y locomotrices en reptiles y aves. Además, esta función permite en humanos, sincronizar el ritmo vigilia-sueño en sujetos ciegos y mejorar los trastornos derivados de los vuelos transmeridiano.

En segundo lugar, un gran bloque de trabajos, se encargan de describir la melatonina como neutralizador de radicales libres. En tercer lugar, otra acción de la melatonina es la estimulación de la función inmune, induciendo la producción de interleukinas y otras citoquinas en linfocitos y monocitos. Un cuarto bloque incluye todas las acciones de la melatonina sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y, por último, un quinto bloque que integra todas las acciones antitumorales.

4.1. Ritmicidad circadiana

La principal acción de la melatonina consiste en la regulación de los ritmos circadianos, que son oscilaciones de las variables biológicas en intervalos regulares de tiempo, mediante su sincronización con fenómenos ambientales, fundamentalmente con la luz. Aunque estos ritmos circadianos tienen un mecanismo de regulación interna (endógeno, mediante un reloj biológico), pueden ser modificados de forma externa, sincronizándose de acuerdo con estímulos externos. Esta red de relojes circadianos permite la

organización temporal de las funciones biológicas en relación con los cambios ambientales periódicos y, por lo tanto, refleja la adaptación al medio ambiente.

La regulación endógena en mamíferos es ejercida por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo medial que conforma el “reloj interno” y genera ritmos circadianos cercanos a las 24h. La regulación externa de los NSQ depende de estímulos ambientales, principalmente las señales luminosas. Por lo tanto, se puede ver el ritmo sueño-vigilia asociado con los ritmos circadianos biológicos como una adaptación al ciclo día-noche. Este mecanismo explica el fenómeno de *jet-lag* en personas que viajan a través de distintas zonas horarias, sintomatología que se experimenta hasta que el ritmo circadiano se sincroniza en base al ciclo de luz/oscuridad de la zona horaria en la que se encuentra.

No obstante, aun siendo los ciclos luz-oscuridad la señal primaria que sincroniza el reloj circadiano con los ciclos ambientales, la melatonina es esencial para la transducción de la información del medio externo en respuestas fisiológicas, de esta forma, la luz inhibe la producción de melatonina mientras que la oscuridad la estimula. También se ha demostrado capaz de sincronizar los relojes en individuos que no perciben la luz o con ritmos circadianos de funcionamiento libre [27]. Esta asociación entre los ritmos de melatonina con el componente endógeno de los ritmos de sueño-vigilia ha llevado a la idea de que la melatonina constituye un “facilitador” del sueño, en consecuencia, resulta útil en el tratamiento de ciertos tipos de insomnio y en el reajuste de los ritmos circadianos (por ejemplo, en el *jet-lag*) [28].

A pesar de que el principal mecanismo de acción por el cual la melatonina ejerce este efecto sobre el sueño parece ser su capacidad cronobiótica sobre el núcleo supraquiasmático, también se ha observado un efecto sobre los centros termorreguladores (induciendo disminución de la temperatura corporal) y cardiovasculares.

4.2. Acciones inmunomoduladoras

Con respecto al papel de la melatonina en la regulación del sistema inmune, la melatonina ejerce efectos inmunomoduladores en animales y humanos, con niveles altos de melatonina que promueven y niveles bajos que suprimen una serie de parámetros del sistema inmunitario. La detección de receptores de melatonina en varios órganos linfoides y en linfocitos sugiere múltiples mecanismos de acción, pudiendo ejercer inmunomodulación por mecanismos de acción directa o indirecta y afectando tanto a la inmunidad innata como adaptativa [5, 20, 29]

Se ha propuesto un doble papel de la melatonina como inmunomodulador [5]:

- Activación del sistema inmune después de un proceso agudo (infección bacteriana o viral) mediante la potenciación de la actividad de las células Th1, la función de los macrófagos (estimula la producción de células progenitoras de macrófagos y granulocitos (GM-CFU); y producción de citoquinas (IL-2, IL-6 e IL-12) e interferón-gamma.
- Restablecimiento a largo plazo de la modulación circadiana de las funciones inmunes, con afectación de la hematopoyesis y la mitosis de timocitos.

4.3. Acción antioxidante y antiinflamatoria

El estrés oxidativo, definido como la perturbación del equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su inactivación por los sistemas antioxidantes, es la causa etiológica de muchas enfermedades, entre las que se encuentran las neoplasias. Debido a su estructura química indólica, y a su potencial redox elevado, la melatonina cede electrones fácilmente, lo que hace que actúe como un potente agente reductor.

Existe gran evidencia científica que avala que la melatonina y sus metabolitos tienen capacidad antioxidante, actuando a través de dos mecanismos (Fig. 8):

- Directo: la melatonina ejerce efectos antioxidantes directos, entre los que se encuentran la neutralización de radicales libres como el radical hidroxilo, el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el anión peroxinitrito y el óxido nítrico.
- Indirecto: La melatonina también es un antioxidante indirecto, estimulando la síntesis de enzimas antioxidantes e inhibiendo la de enzimas prooxidantes.
 - Enzimas antioxidantes: Induce la expresión de las glutatión peroxidasa y reductasa, la superóxido dismutasa y catalasa, cuatro enzimas con importante acción antioxidante.
 - Enzimas pro-oxidantes y pro-inflamatorias: Inhibe la expresión de enzimas prooxidantes y proinflamatorios, como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la ciclooxigenasa 2 (COX 2), bajo regulación genómica [25].

Se calcula que una molécula de melatonina, a través de esta cascada, puede depurar hasta cuatro especies reactivas de oxígeno. Esta actividad, sumada a su efecto como regulador endógeno de la expresión de los enzimas antioxidantes y pro-oxidantes, es por lo que se considera a la melatonina como el antioxidante endógeno más potente del organismo [25].

Por otro lado, se ha comprobado que la melatonina aumenta la eficiencia de otros antioxidantes naturales, ya que el grupo N-acetil posee una acción sinérgica con las vitaminas C y E [10].

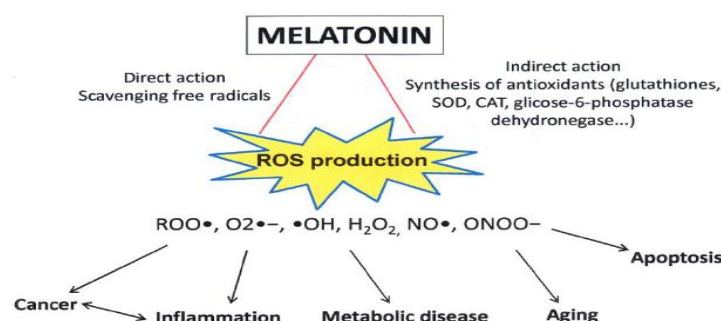


Figura 8. Acciones antioxidantes de la melatonina (Chuffa et al. 2013) [30]

Este papel antioxidante de la melatonina contribuye a sus efectos inmunoestimulantes y también supone un efecto antiinflamatorio indirecto al reducir la formación de óxido nítrico, ejerciendo con ello una disminución de la respuesta inflamatoria [16].

4.4. Acción Moduladora del Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas

El eje hipotálamo-hipófisis-gónadas regula la función reproductora. En el hipotálamo, se produce GnRH, que a nivel hipofisario favorece la producción de LH y FSH. En las gónadas, las hormonas hipofisarias favorecen la producción de esteroides sexuales, que por retroalimentación negativa inhiben la síntesis de GnRH en el hipotálamo.

La melatonina parece tener un papel importante en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, gracias al cual ejerce efectos fisiológicos sobre la reproducción y maduración sexual en mamíferos. Actúa a dos niveles:

- Hipotálamo: Inhibe la producción de GnRH en un patrón cíclico durante un periodo de 24 horas.
- Hipófisis: Inhibe la producción de LH/FSH.

El patrón rítmico de melatonina dirige el ciclo reproductivo a través de la influencia del fotoperíodo en la secreción pulsátil de LH. Gracias a estos mecanismos, la melatonina parece jugar un papel importante en la regulación de la fisiología reproductiva en los animales de reproducción estacional y en el inicio de la pubertad, pudiendo ejercer un efecto inhibitorio sobre la misma [31].

4.5. Acciones antitumorales

La primera referencia del papel de la glándula pineal en el crecimiento y diseminación de tumores malignos se atribuye a Georgiou en 1929. Posteriormente, en 1977, Vera Lapin coordinó en Viena la primera reunión internacional que supuso una puesta en común del conocimiento que había hasta el momento sobre la acción de la glándula pineal en el control neurohormonal del cáncer. A partir de este momento, se produjo un importante aumento en la investigación y realización de estudios sobre el papel de la glándula pineal en la etiología y patogénesis de las enfermedades neoplásicas. Numerosos estudios han demostrado las propiedades oncostáticas de la melatonina sobre diversos tumores, especialmente en los tumores hormono-dependientes. Posteriormente múltiples estudios han seguido esta línea de investigación, con el objetivo de dar con herramientas terapéuticas para el tratamiento del cáncer en humanos [32].

Los efectos oncostáticos de la melatonina han sido estudiados en numerosos tipos de tumores, incluidos el de próstata, sarcomas, colorrectal, hepatocarcinoma, melanoma, tumores neurales, carcinomas laríngeos, cáncer de ovarios, de mama, de piel y de cérvix. La mayoría de los estudios ha sido desarrollados *in vitro*, empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos (por ejemplo, las MCF-7 de cáncer de mama), pero también se han realizado estudios *in vivo*, en modelos tumorales murinos. La conclusión general es que la melatonina inhibe la proliferación celular, induce apoptosis y reduce la invasividad y respuesta quimiotáctica en la mayoría de las líneas celulares tumorales;

además de reducir la génesis y el desarrollo tumoral en tumores mamarios químicamente inducidos en roedores.

Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar las propiedades oncostáticas de la melatonina (Fig. 9): interacción con las vías de señalización estrogénicas, influencia en la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células tumorales, propiedades antioxidantes, antiangiogénicas, acciones inmunomoduladoras de la respuesta humoral y celular, inhibición de la telomerasa, reducción de la invasividad celular, efectos cronobióticos, acciones epigenéticas, así como la influencia de la melatonina en el transporte y metabolismo de ácidos grasos. Todas ellas son propiedades de la indolamina que explican aspectos particulares de sus acciones en diferentes etapas del proceso cancerígeno.

A lo largo de este trabajo, nos centraremos en los efectos de la melatonina sobre el cáncer de mama, los cuales se han relacionado principalmente con su interacción con la vía de señalización estrogénica, comportándose como una hormona antiestrogénica. Sin embargo, directa o indirectamente, en la interacción de la melatonina con las vías de señalización estrogénica, están implicados otros mecanismos oncostáticos, ya que algunos de ellos como la actividad de la telomerasa y la función inmune se relacionan indirectamente con los niveles de estrógenos.

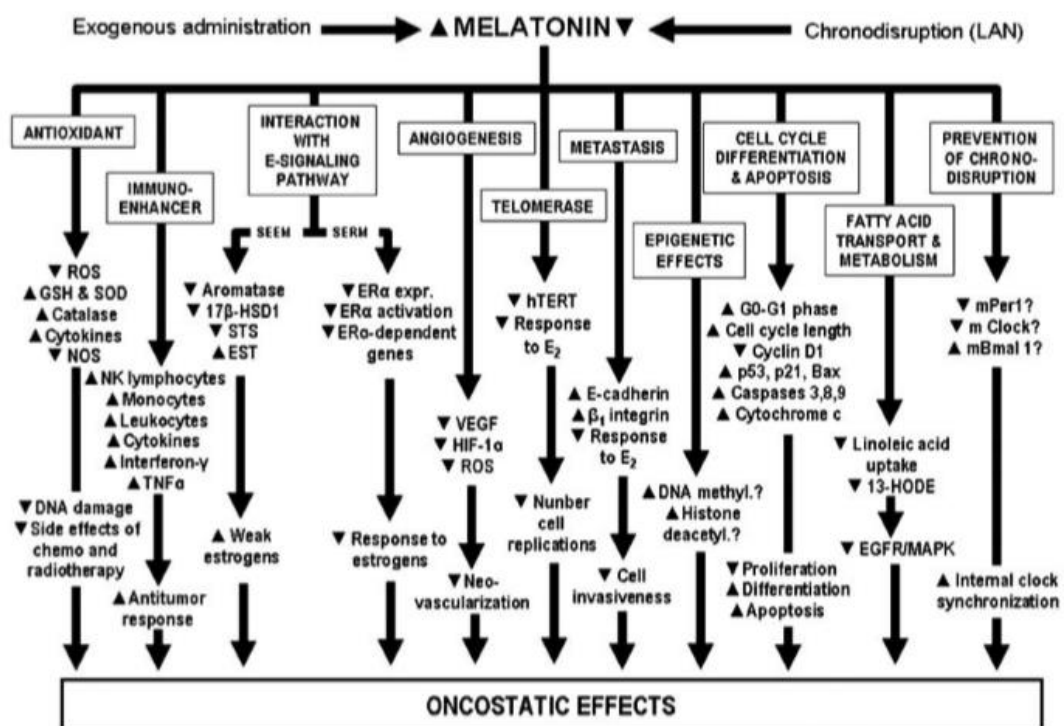


Figura 9. Resumen de los mecanismos involucrados en las propiedades oncostáticas de la melatonina (Mediavilla et al. 2010) [32].

4.6. Otras acciones

También han sido descritos efectos de la melatonina sobre la masa corporal y la regulación de la masa ósea. La melatonina es conocida por su papel en el gasto energético y la regulación de la masa corporal en los mamíferos al prevenir el aumento de la grasa corporal con la edad, a través de su unión a receptores MT₂ en el tejido adiposo. En base a estos hallazgos la melatonina podría ser utilizada como un tratamiento preventivo frente a las alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad, que supone a su vez un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de mama.

Además, la melatonina aumenta la masa ósea al promover la diferenciación celular de los osteoblastos y la síntesis de colágeno tipo I en estas células, además de inhibir la resorción ósea mediante la regulación negativa de la formación y activación de osteoclastos mediada por RANKL [16]. Es por ello que su administración junto a fármacos antiaromatasa podría reducir la osteoporosis inducida por ellos, así como potenciar sus efectos al añadir sus propias acciones como agente SERM [33].

MELATONINA, CÁNCER DE MAMA Y ESTRÓGENOS

La potencial implicación de la melatonina en la prevención y/o tratamiento del cáncer de mama hormono-dependiente, ha sido considerada en base a sus múltiples propiedades oncostáticas, siendo especialmente clave su interacción con los estrógenos.

Este hecho se asienta sobre cada una de las acciones antitumorales de la melatonina, que estarían a su vez directa o indirectamente relacionadas con su interacción con la vía de señalización estrogénica (Fig. 10). En primer lugar, cabe reseñar el efecto indirecto ejercido por la melatonina sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, conduciendo a una disminución en los niveles de estrógenos gonadales, implicados en el crecimiento tumoral. En segundo lugar, ya que la carcinogenicidad de los esteroides es consecuencia de los radicales superóxido e hidroxilo generados en su metabolismo, llevado a cabo por enzimas del citocromo P450, la acción antioxidante de la melatonina podría tener una implicación fundamental en el cáncer de mama, actuando esta indolamina como un potente eliminador de estos radicales libres y con ello atenuando el daño oxidativo inducido por el estradiol en el tejido mamario [34]. Por otro lado, sus propiedades inmuno-potenciadoras también se relacionan indirectamente con su acción antiestrogénica, ya que los estrógenos a altas concentraciones ejercen una supresión de la respuesta inmune celular [35]. Finalmente, el efecto inhibitor de la melatonina sobre la actividad de la telomerasa evidenciada en células de cáncer de mama humano MCF-7 también guarda relación con sus efectos antiestrogénicos, ya que estos parecen incrementar la actividad de la telomerasa [36].

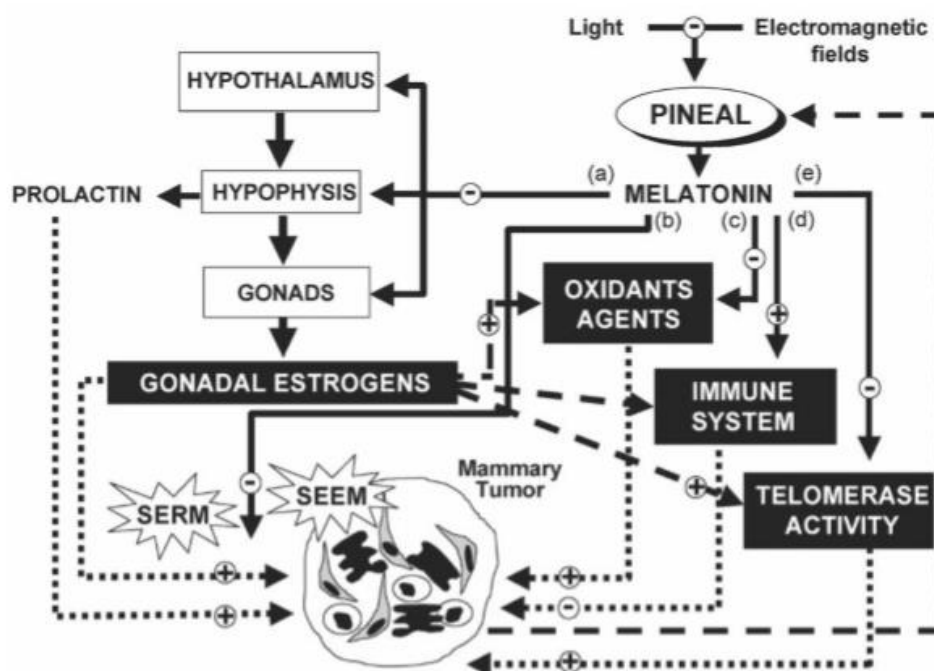


Figura 10. Mecanismos mediante los cuales la melatonina regula la carcinogénesis mamaria (Cos et al. 2006) [5].

Sin obviar el resto de las acciones oncostáticas de la melatonina, en este trabajo, vamos a enfocarnos en aquellas acciones basadas en su interacción con la síntesis o con las vías de señalización de estrógenos. La melatonina puede influir sobre las acciones estrogénicas de tres maneras diferentes [6, 20] (Fig. 11):

1. Regulando negativamente la síntesis gonadal de esteroides y, en consecuencia, disminuyendo sus niveles circulantes.
2. Interactuando con el receptor de estrógenos (ER), comportándose así, como un SERM (modulador selectivo del receptor estrogénico).
3. Regulando la actividad de algunas de las enzimas involucradas en la síntesis de estrógenos, es decir, comportándose como un SEEM (modulador selectivo de los enzimas que intervienen en la síntesis de estrógenos).

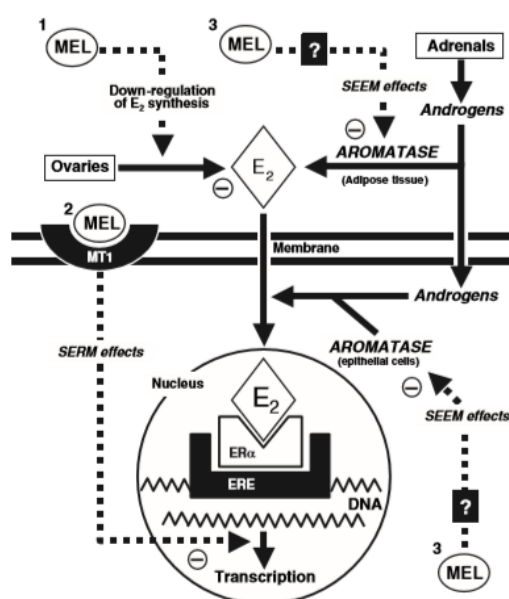


Figura 11. Representación de los tres mecanismos de acción de la melatonina en la reducción del crecimiento tumoral mediado por estrógenos: (1) regulación negativa de la síntesis gonadal de esteroides (2) disminución de la expresión del receptor de estrógenos (ERα) e inhibición de la unión del complejo E2-ER al elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en el DNA, comportándose, por tanto, como un SERM (este efecto depende de la unión de la melatonina a receptores específicos de membrana, MT1), y (3) actuando como modulador selectivo de enzimas estrogénicas (SEEM) disminuyendo la actividad aromatasa a nivel tumoral y de los adipocitos mamarios, responsable de la biosíntesis local de estrógenos a nivel mamario. (Sánchez-Barceló et al. 2005) [6].

1. Regulación de la concentración plasmática de estrógenos

La glándula pineal es un órgano neuroendocrino que desempeña un papel esencial en la regulación de la fisiología reproductiva a través de la síntesis y secreción de melatonina. Esto se debe a que esta indolamina es capaz de estimular la actividad gonadal y, por ende, controlar la reproducción estacional, gracias a su unión a receptores a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas [7]. Aunque en humanos esta acción de la melatonina sobre el sistema reproductor es controvertida, se ha propuesto una relación inversa entre los niveles de melatonina sérica y la actividad ovárica, así como un cierto papel de esta indolamina en la modulación del eje reproductivo neuroendocrino. Además, se han

evidenciado efectos estimuladores directos de la melatonina sobre la esteroidogénesis ovárica en las células de la granulosa lútea humana, así como la presencia de receptores funcionales de melatonina en células de folículos antrales y cuerpos lúteos de ovarios de ratas, lo cual va a favor de esta teoría [6].

La melatonina modula las concentraciones de FSH y LH actuando sobre el hipotálamo mediobasal, mientras que el control de la secreción de PRL depende de su acción sobre la pars tuberalis, siendo los estrógenos y la PRL las principales hormonas implicadas en el desarrollo de neoplasias mamarias. La distribución de los receptores de membrana de la melatonina (MT₁ y MT₂) en la pars tuberalis, en las diferentes áreas hipotalámicas (principalmente SNC, pero también el área medial preóptica, el hipotálamo anterior y los núcleos hipotalámicos dorsomedial y ventromedial) y en la pituitaria anterior apoyan este control de la melatonina sobre las gonadotrofinas. Aunque todavía no hay evidencias directas de la presencia de receptores de melatonina en la pituitaria gonadotropa, se pueden encontrar pruebas indirectas, como la inhibición por parte de la melatonina de la liberación de LH y FSH inducida por GnRH en cultivos de células de la pituitaria, que la sugieren. La regulación negativa de estas hormonas induce una disminución de la síntesis de esteroides gonadales [38].

Basándose en acciones descritas de la melatonina sobre el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, *Cohen et al.* propusieron, en 1978, una posible implicación de la disminución de la función pineal en la génesis del cáncer de mama. Estos autores sugirieron que la disminución en la función pineal, independientemente de la causa que lo origine, disminuye los niveles de melatonina, induciendo un "hiperestrogenismo" relativo, que subyace en el desarrollo del cáncer de mama en los seres humanos [39]. Para apoyar su hipótesis se sirvieron de datos indirectos como la fuerte correlación observada entre la calcificación pineal (interpretada como función pineal disminuida) y la aparición de cáncer de mama, así como la baja incidencia de cáncer de mama en pacientes psiquiátricos que toman clorpromazina, fármaco que aumenta los niveles séricos de melatonina [3].

Posteriormente Tamarkin y colaboradores describieron, en 1982, la relación entre la concentración plasmática de melatonina y el cáncer de mama al observar que mujeres con adenocarcinomas mamarios en los que estaban presentes los receptores estrogénicos tenían concentraciones plasmáticas nocturnas de melatonina significativamente más bajas que las mujeres sanas o aquellas con tumores que eran receptor estrogénico negativo [40].

Desde entonces, numerosas investigaciones han apoyado esta hipótesis de la implicación de la melatonina en la modulación de la función ovárica, ejerciendo una regulación a la baja de los niveles de estrógenos, al haberse evidenciado varios aspectos a su favor, que sugieren en su conjunto que concentraciones altas de melatonina a nivel tumoral pueden ser reflejo del estado de diferenciación y constituir un marcador de buen pronóstico [41,42].

Además de los estudios clínicos y epidemiológicos, existen evidencias de estudios *in vivo* en modelos animales (la mayoría sobre ratas con cáncer de mama inducido químicamente) que respaldan la hipótesis de que las acciones oncostáticas de

melatonina en tumores mamarios hormono-dependientes se basan en acciones antiestrogénicas. A pesar de las diferentes aproximaciones experimentales llevadas a cabo, lo que todas tienen en común es que se basaron en la comparación entre los efectos del carcinógeno en animales con función pineal incrementada tras ser sometidos a manipulaciones potenciadoras de las acciones de la melatonina y aquellos sometidos a una disminución o supresión de la funcionalidad pineal. Las conclusiones generales son que los animales con función pineal aumentada o aquellos tratados con melatonina, en comparación con los animales pinealectomizados o aquellos animales con niveles disminuidos de melatonina, presentan un aumento en la latencia tumoral, menor incidencia de cáncer de mama, reducción en el número y tamaño de los tumores, reducción en la tasa de crecimiento tumoral, mayor incidencia de regresión tumoral en tumores previamente inducidos, disminución de los niveles séricos de estradiol y gonadotropinas FSH y LH, y disminución en la concentración de receptores de estrógenos a nivel tumoral [38, 43].

A pesar de que inicialmente, estos efectos oncostáticos de la melatonina *in vivo* fueron atribuidos a la regulación negativa que ejerce sobre el eje neuroendocrino, y la consiguiente reducción de los niveles de hormonas implicadas en el desarrollo mamario tales como el estradiol y la prolactina, estudios posteriores han demostrado que la melatonina es capaz de actuar a más niveles de la vía de señalización estrogénica. En ellos, llevados a cabo sobre tumores de mama ER-positivos inducidos químicamente en ratas ovariectomizadas y tratadas con estradiol exógeno, evidenciaron una disminución del crecimiento tumoral al ser expuestos a situaciones conocidas por sus efectos estimulantes de la función pineal (anosmia, subnutrición o exposición a bajas temperaturas, asociados a privación lumínica), objetivándose incluso una reducción de la concentración del receptor de estrógenos a nivel tumoral (Fig. 12). La conclusión a la que se llegó fue, por tanto, que en este caso los efectos tumorales no podían explicarse únicamente por una reducción de los niveles de estrógenos circulantes dependientes de la pineal, puesto que estos habían sido administrados de forma exógena. Por tanto, los resultados de estos experimentos y otros similares sugirieron que la melatonina tiene capacidad para contrarrestar directamente los efectos de los estrógenos a nivel tumoral, surgiendo estudios *in vitro* que han demostrado que, a nivel tumoral mamario, la melatonina interfiere con el receptor de estrógenos, contrarrestando sus efectos, actuando como un SERM, y también regula la actividad de algunas enzimas que controlan la síntesis local de estrógenos, comportándose, así como un SEEM. En la misma molécula tenemos ambas propiedades para neutralizar selectivamente los efectos de los estrógenos en la mama [5].

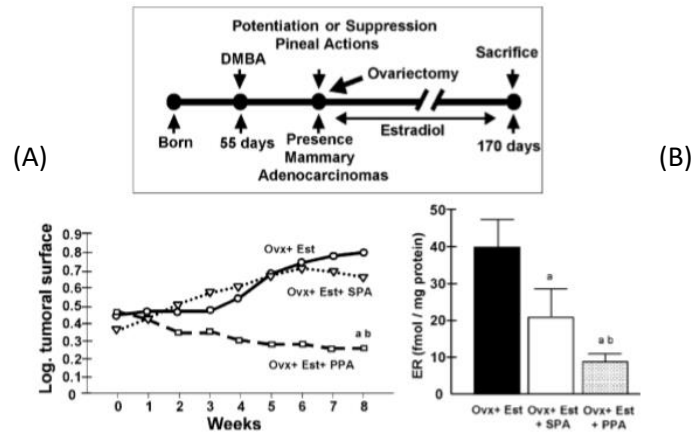


Figura 12. (A) Cambios temporales en el tamaño tumoral. (B) Concentración del receptor de estrógenos en tumores mamarios. Las ratas con adenocarcinomas inducidos por DMBA de 1 cm de diámetro fueron ovariectomizadas (Ovx) y sometidas a manipulaciones potenciadoras (PPA) o supresoras (SPA) de las acciones pineales, siendo su influencia en la evolución del tamaño tumoral valorada de forma semanal. Los animales también recibieron inyecciones diarias de Estradiol (Est) o del diluyente. Las diferencias entre los tratamientos a las 8 semanas de experimento fueron: vs. (a) Ovx + Est ($p < 0.01$), vs. (b) Ovx + Est + SPA ($p < 0.01$). (Modificado de Cos y Sánchez-Barceló 2000) [43].

2. Acciones moduladoras de la actividad de los receptores estrogénicos (SERM)

Se ha evidenciado la interacción existente entre la melatonina y el receptor de estrógenos (ER) comportándose como un Modulador Selectivo del Receptor Estrogénico (SERM), sin embargo, en cuanto a las acciones de la melatonina como SERM, esta indolamina posee unas características especiales que las diferencian de otros antiestrógenos como el tamoxifeno, ya que no se une al receptor de estrógenos ni interfiere en modo alguno con la unión de estrógenos al mismo, sino que actúa mediante la unión a sus propios receptores de membrana (MT_1), y a través de esta unión es capaz de interactuar con la vía de señalización del receptor de estrógenos (Fig. 14).

Estos efectos antiestrogénicos directos ejercidos por la melatonina en las células tumorales mamarias han sido evidenciados en estudios *in vitro*, la mayoría de ellos llevados a cabo sobre una línea celular de cáncer de mama hormono-dependiente MCF-7, obtenida del derrame pleural de mujeres con tumor de mama metastásico, habiéndose conocido posteriormente que este comportamiento se extiende a otras líneas celulares tumorales mamarias que expresan receptores estrogénicos, lo cual refuerza la hipótesis de que las acciones oncostáticas de la melatonina son mediadas a través de sus efectos en la vía de señalización de estrógenos en estas células [5].

Esta línea celular tumoral MCF-7 representa un buen modelo para el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a la acción estrogénica en el cáncer de mama ya que posee receptores estrogénicos, $ER\alpha$ y $ER\beta$ y de melatonina MT_1 , dependiendo su crecimiento de la presencia de estrógenos en el medio de cultivo [5]. En esta línea se ha demostrado que la melatonina a concentración 1 nM (equivalente a la presente en el suero de mamíferos durante el periodo nocturno) es capaz de contrarrestar la proliferación e invasividad de las células tumorales mamarias inducida por los estrógenos, aumentando su sensibilidad a los antiestrógenos, como el tamoxifeno e

inhibiendo de esta forma, la expresión de proteínas, factores de crecimiento y protooncogenes regulados por estrógenos [6].

La interacción entre la melatonina y el estradiol también tiene lugar a través de efectos reguladores sobre la cinética del ciclo celular (Fig. 13). El estradiol estimula la proliferación celular e induce la progresión celular detenida en la fase G_1 -S, mientras que tanto la melatonina como el tamoxifeno, antiestrógeno no esteroideo utilizado en el tratamiento del cáncer de mama, ejercen un efecto antiproliferativo basado en un retraso en la transición G_1 -S, deteniendo el ciclo celular en la fase G_1 . Estudios *in vitro* han demostrado que la incubación con melatonina aumenta la fracción de células en la fase G_0 / G_1 del ciclo celular, al tiempo que provoca una reducción del 50% en la proporción de células en la fase S y disminuye la síntesis de ADN en aquellas que hayan progresado a esta fase, pudiendo la melatonina aumentar temporalmente la duración del ciclo celular y luego detener la progresión en el mismo y / o retrasar el reclutamiento de algunas células quiescentes o no proliferativas [5].

El efecto modulador de la melatonina en el ciclo celular parece tener relación con su capacidad para cambiar el equilibrio de la proliferación a la diferenciación, a través de los efectos de esta indolamina en la expresión de algunas de las proteínas involucradas en el control del ciclo celular. En esta línea, se ha demostrado que la melatonina, a concentraciones nanomolares, aumenta la expresión de p53 y p21WAF1, que a su vez activan una cascada de señalización intracelular que conduce a un bloqueo de la progresión celular de G_1 a S [44]. Como consecuencia, la acumulación de células en la fase G_1 las induce a entrar en la fase G_0 , un estado de reposo que conduce a las células a una mayor diferenciación [5].

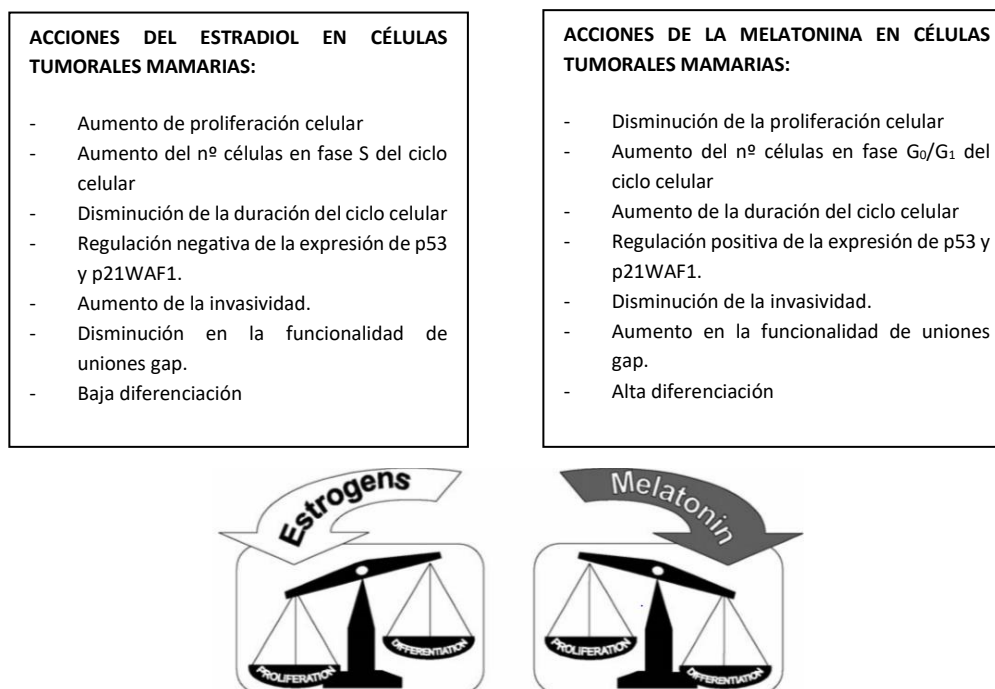


Figura 13. La interacción entre melatonina y estradiol tiene lugar a través de sus efectos en el balance entre proliferación y diferenciación celular. El estradiol estimula la proliferación y reduce la diferenciación, mientras que la melatonina ejerce un balance inverso, favoreciendo la diferenciación e inhibiendo la proliferación celular (Cos et al. 2006) [5].

En resumen, el estradiol estimula la proliferación de las células tumorales, induce su progresión en el ciclo celular y brinda una menor oportunidad para que se diferencien. Por el contrario, la melatonina parece cambiar el equilibrio en la dirección opuesta, al promover la diferenciación e inhibir la proliferación de las células tumorales mamarias, permitiendo además que alcancen características ultraestructurales de células diferenciadas terminales (células más pequeñas, presencia de haces de filamentos de citoqueratina, retículo endoplasmático rugoso conspicuo y cisternas de Golgi, nucléolos prominentes a nivel nuclear). Siendo estos cambios ultraestructurales contrarrestados por los estrógenos [5].

Este aumento de la diferenciación de las células tumorales inducida por la melatonina también se extiende al comportamiento metastásico de las células MCF-7, siendo la movilidad e invasión de las células tumorales fenómenos dependientes de la presencia de moléculas de adhesión a la superficie celular implicadas en interacciones célula-célula y célula-matriz, y suponiendo la pérdida de expresión de estas moléculas de adhesión una pobre diferenciación celular, un aumento de la invasividad de las células tumorales, y por tanto, un mal pronóstico del proceso tumoral [5]. Es bien sabido que los estrógenos inducen cambios propios del fenotipo maligno, estimulando el potencial invasivo y metastásico de las células cancerosas, aumentando la capacidad de las células MCF-7 para formar tumores y producir metástasis a distancia en los ratones y mejorando la capacidad de estas células *in vitro* para proliferar e invadir la membrana basal [45].

Por el contrario, *in vitro*, la presencia de melatonina a dosis fisiológicas (1 nM) en el medio de cultivo, reduce la invasividad de las células MCF-7 al disminuir significativamente su capacidad de fijación a la membrana basal y contrarresta los efectos estimulantes del 17 β -estradiol sobre la adhesión y migración celular. En cuanto a su efecto sobre las moléculas de adhesión, la melatonina aumenta la expresión en células MCF-7 de integrina- β 1 y E-cadherina, dos moléculas importantes en interacciones célula-célula y célula-matriz respectivamente, reduciendo la invasividad de las células tumorales al promover su diferenciación. El efecto anti-invasivo *in vitro* de la melatonina también se ha correlacionado con una disminución *in vivo* de la tumorigenicidad de las células MCF-7 [45].

Se ha propuesto que otro de los mecanismos a través de los cuales la melatonina promueve la diferenciación celular, es a través del incremento del nivel de comunicación intercelular mediante uniones gap en las células de cáncer de mama, ya que dichas uniones gap intervienen en el control de la proliferación y diferenciación celular y desempeñan un papel crucial en la supresión tumoral, habiéndose observado anormalidades a este nivel en células tumorales mamarias, con una pérdida progresiva de las mismas y de E-cadherina conforme avanza la enfermedad metastásica [5].

A pesar de que los mecanismos involucrados en las acciones antiestrogénicas de la melatonina aún están siendo estudiados, el mecanismo de actuación de la melatonina como ya se ha mencionado, a diferencia de los antiestrógenos clásicos, parece consistir en una disminución de la expresión de ER α en los tejidos hormono-dependientes junto a una inhibición de la unión del complejo E2-ER al elemento de respuesta al estrógeno (ERE) a nivel del ADN, siendo estos efectos dependientes de la unión de la melatonina a

receptores específicos de membrana (MT_1), habiéndose observado que la sobreexpresión de estos receptores en las células MCF-7 aumenta su respuesta a los efectos antiestrogénicos de la melatonina [46]. Además, como se indicó anteriormente, una de las propiedades deseables de un SERM es su capacidad para bloquear específicamente el $ER\alpha$, pero no el $ER\beta$, cualidad que cumple la melatonina, actuando como inhibidor específico de la activación transcripcional mediada por $ER\alpha$ inducida por E2. Esto es importante ya que la sensibilidad de las células tumorales mamarias depende precisamente del ratio $ER\alpha / ER\beta$, siendo abolida en caso de sobreexpresión de $ER\beta$ [22].

Por lo tanto, la melatonina se comporta como un antiestrógeno que no se une al receptor de estrógeno sino a sus propios receptores de membrana, y a través de esta unión es capaz de interactuar con la vía de señalización del receptor de estrógenos. Otra diferencia de la melatonina respecto a otros antiestrógenos sintéticos como el tamoxifeno, es que no afecta a la unión de coactivadores del $ER\alpha$, lo que pone de manifiesto que sus acciones antiestrogénicas se llevan a cabo mediante mecanismos distintos. Asimismo, es importante señalar que en ausencia de estradiol la melatonina no afecta a la actividad transcripcional del receptor de estrógenos [5, 6].

En cuanto a los vínculos de correlación entre la vía de señalización estrogénica y la melatonina, lo que parece enlazar estas dos vías podría ser la modulación opuesta de las concentraciones AMPc intracelular, siendo activado el $ER\alpha$ mediante altas concentraciones intracelulares de AMPc. En las células tumorales mamarias, los estrógenos activan la adenilato ciclasa aumentando el AMPc intracelular, y este último sinergiza las acciones genómicas de los esteroides, ya que potencia la transcripción mediada por el ER. Por el contrario, la melatonina, actuando a través del receptor MT_1 inhibe la actividad adenilato ciclasa, con la consiguiente disminución del AMPc; siendo este un posible mecanismo por el cual esta indolamina disminuye la actividad transcripcional de $ER\alpha$ inducida por el E2 y la forskolina [5, 6].

Por otra parte, la calmodulina (CaM) actúa como un modulador de la actividad transcripcional de $ER\alpha$ induciendo su fosforilación, aunque no de $ER\beta$, de tal modo que la asociación de CaM con el complejo E2-ER facilita su unión a ERE. En consecuencia, otro posible vínculo de interacción melatonina-estradiol por el cual la melatonina desempeña una acción antiestrogénica se basa en su capacidad para unirse a CaM e inactivar el complejo Ca^{++}/CaM , contrarrestando así sus posibles efectos sobre la transcripción dependiente del $ER\alpha$. [22]. Se ha descrito también que la sobreexpresión del receptor de ácido retinoico ($ROR\alpha$) estimula la actividad transcripcional del $ER\alpha$, y este efecto es inhibido por la melatonina.

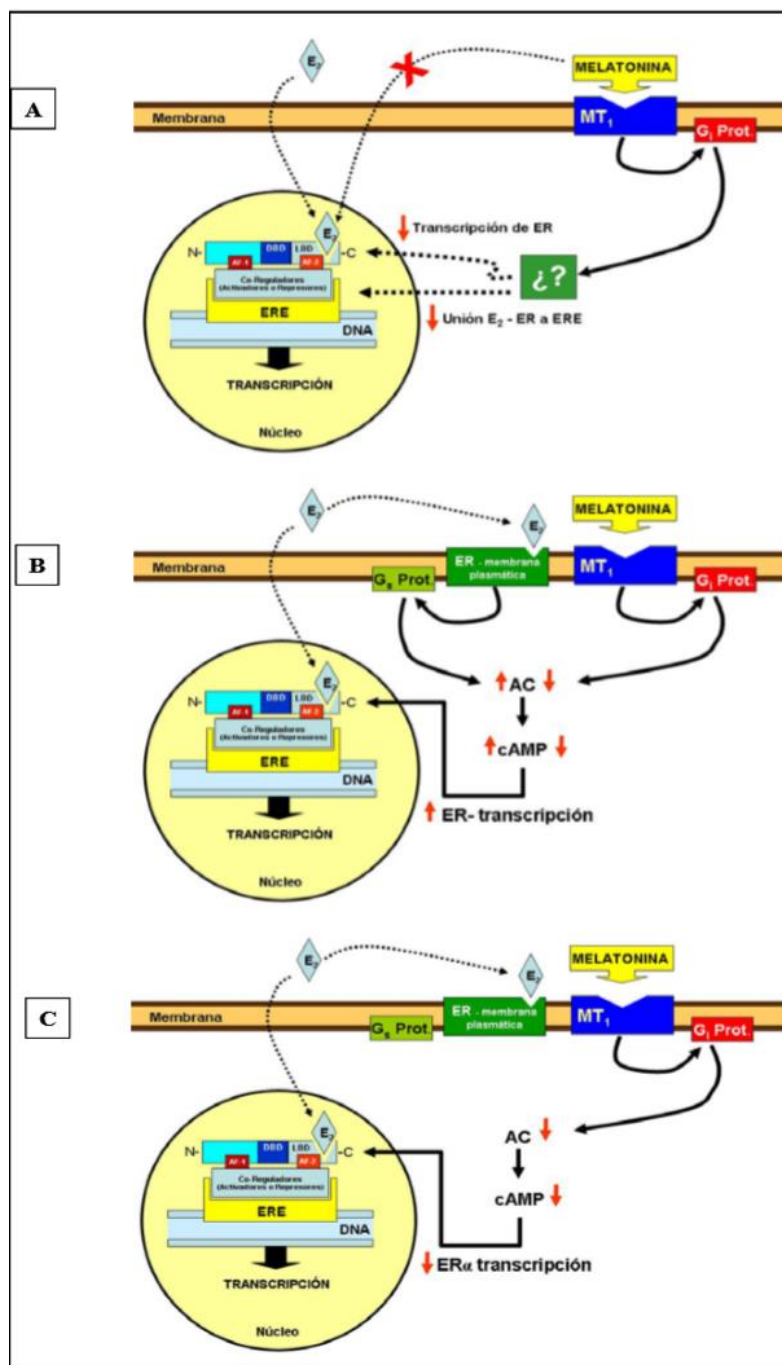


Figura 14. Esquema de las acciones SERM de la melatonina. (A) Los efectos antiestrogénicos de la melatonina están mediados a través de su unión al receptor de membrana (MT₁), permitiendo su unión al mismo el bloqueo de la unión del complejo E2-ERE al ADN, impidiendo así la transcripción. (B) La unión de la melatonina al complejo Ca⁺⁺/CaM impide la unión de esta proteína al ER, concretamente al subtipo α , lo que inhibe el proceso de transcripción. (C) La unión de la melatonina a su receptor MT₁ inhibe la actividad adenilato ciclasa, con la consiguiente disminución del AMPc; impidiendo con ello la fosforilación del ER, necesaria para el proceso de transcripción (Modificado de Sánchez-Barceló et al. 2003) [47].

3. Acciones moduladoras de los enzimas que intervienen en la síntesis de estrógenos (SEEM).

En los últimos años, se ha demostrado un tercer mecanismo neuroendocrino a través del cual la melatonina es capaz de reducir el desarrollo de los tumores mamarios hormono-dependientes, que consiste en la regulación por parte de la melatonina de algunos enzimas responsables de la síntesis local de estrógenos, comportándose como un modulador selectivo de los enzimas estrogénicos (SEEM). En esta línea cabe reseñar, como se ha mencionado previamente, que dos tercios de los tumores mamarios se dan en mujeres postmenopáusicas, en las cuales los ovarios han dejado de ser funcionales y cuyos niveles circulantes de estrógenos son bajos, lo que pone de manifiesto la importancia de la síntesis de estrógenos *in situ*. Así, durante el período reproductivo, la práctica totalidad de los estrógenos circulantes tienen su origen en el ovario. Sin embargo, en la menopausia, los estrógenos que actúan sobre el tejido mamario proceden mayoritariamente, y excepto por una pequeña contribución ovárica, de su biosíntesis *in situ* en los tejidos extragonadales, principalmente en el tejido adiposo mamario, a partir de los andrógenos circulantes.

Las células epiteliales tumorales mamarias contienen todas las enzimas responsables para la síntesis local de estrógenos, siendo los principales precursores la dehidroepiandrosterona (DHEA) y su sulfato (DHEAS), que provienen principalmente de la corteza suprarrenal (Fig. 15). En condiciones normales, la DHEA y la androstenediona procedentes del torrente sanguíneo llegan al tejido mamario, donde serán convertidos a estrona gracias a la acción de la P450 aromatasas, o bien en androstenediol o testosterona respectivamente, en una reacción mediada por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD1). Este mismo enzima, además, es capaz de realizar la interconversión de la estrona en estradiol. Finalmente, las sulfotransferasas (EST), se encargan de catalizar la unión de un grupo sulfato a la estrona o al estradiol, inactivándolos y permitiendo que se liberen a la circulación desde donde actúan a modo de reservorio de estas hormonas. La activación de estas hormonas mediante la hidrólisis de su grupo sulfato tiene lugar mediante la acción de las sulfatasas (STS) [48].

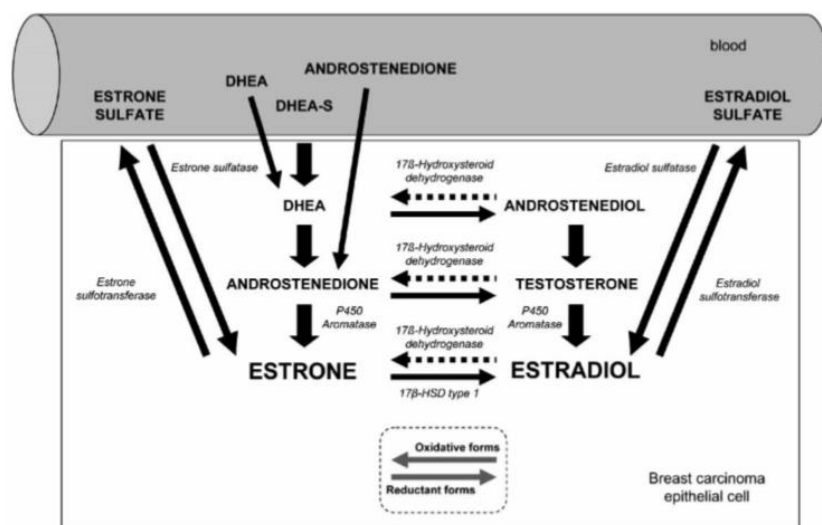


Figura 15. Mecanismos enzimáticos implicados en la biosíntesis de estrógenos en las células tumorales mamarias (Cos et al. 2008) [49].

Sin embargo, lo característico, es que, a nivel tumoral mamario, existe una desregulación de la actividad y expresión de dichas enzimas respecto al tejido mamario sano, siendo esta una de las dianas sobre la que podría actuar la melatonina al comportarse como un SEEM. Concretamente en el cáncer de mama dependiente de estrógenos encontramos [3]:

- Aumento de la actividad y expresión de la aromatasa, enzima que cataliza la transformación de andrógenos a estrógenos, a nivel tumoral mamario respecto al tejido sano, siendo una de las razones por las que la concentración de estrógenos se eleva en el cáncer de mama.
- Aumento de la expresión de la sulfatasa (STS) a nivel tumoral mamario, enzima que hidroliza varios esteroides sulfatados en estrona y estradiol, siendo la producción de estrona a través de esta vía del orden de diez veces superior que la obtenida por la aromatasa y pudiendo actuar el sulfato de estrógeno como reserva de estrógenos.
- Disminución de la actividad y expresión de la estrógeno sulfotransferasa (EST), enzima involucrada en la protección de los tejidos periféricos del efecto del exceso estrogénico al transformar los estrógenos en su forma sulfatada biológicamente inactiva.
- Disminución de las isoformas oxidativas de la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), como 17 β -HSD2, que catalizan la formación de esteroides de baja actividad, ejerciendo así un papel protector contra las acciones de los esteroides en diferentes tejidos, incluida la glándula mamaria. Sin embargo, en las células tumorales existe una sobreexpresión de las isoformas reductoras, como la 17 β -HSD1, las cuales ejercen el efecto opuesto, transformando la estrona débil en estradiol biológicamente activo.

En resumen, en el tejido mamario normal, la producción local de estrógenos se desplaza hacia la producción de estrona de baja actividad mientras que en los adenocarcinomas de mama predomina la formación del 17 β -estradiol activo. Esto se debe a que, en el tejido normal, la actividad de la 17 β -HSD2, que convierte el 17 β -estradiol en estrona, y el EST, que inactiva la estrona y el 17 β -estradiol, son altas y protegen de los efectos estrogénicos excesivos. Por el contrario, en el tejido del carcinoma de mama, la sulfatasa, la aromatasa y la 17 β -HSD1 tienden a sobreexpresarse, mientras que EST y 17 β -HSD2 se reducen con frecuencia, lo que puede provocar la acumulación de 17 β -estradiol activo [3].

3.1. Acciones anti-aromatasa de la melatonina

Una de las principales vías de síntesis de estrógenos en las células tumorales mamarias es la vía de la aromatasa, que transforma andrógenos en estrógenos. Este enzima forma parte de la superfamilia de citocromos P450, que consta de dos componentes: la proteína aromatasa citocromo P-450 y, junto con ella, una flavoproteína ubicua, NADPH-citocromo P-450 reductasa. El gen que codifica la proteína del citocromo P-450 se denomina CYP19 y su transcripción está regulada de manera altamente específica en cada tejido, dependiendo de la activación de diferentes promotores. La actividad y expresión de la aromatasa es mayor en el tejido tumoral mamario que en el tejido normal mamario, especialmente en el compartimento estromal [5].

La mayoría de los estudios *in vitro* que han demostrado los efectos directos de la melatonina en el control de las enzimas involucradas en la biosíntesis y la transformación de estrógenos se han llevado a cabo en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, buen modelo ya que, además de los receptores de melatonina contiene Arom, STS, 17-HSD1 y EST, enzimas involucradas en dichos procesos [6,7]. Concretamente, las células MCF-7 expresan aromatasa y, por consiguiente, son capaces de sintetizar estrógenos *in situ* a partir de andrógenos, que estimularán la proliferación celular tumoral mediante su unión al receptor de estrogénico [5].

Se ha comprobado que la melatonina, a concentraciones fisiológicas (la misma que proporciona los mayores efectos antiproliferativos y antiinvasores), disminuye la actividad de la aromatasa y la expresión de su ARNm en las células MCF-7 tanto en condiciones basales como al estar estimulada por AMPc o cortisol, contrarrestando con ello la proliferación celular inducida por la testosterona. Este efecto anti-aromatasa ejercido por la melatonina está mediado por la unión al receptor MT₁, siendo este un mediador principal en la vía de señalización de la melatonina en el cáncer de mama [50].

Este efecto oncostático de la melatonina sobre la enzima aromatasa también se ha confirmado *in vivo* en roedores con carcinomas mamarios inducidos por DMBA. En aquellos roedores tratados con melatonina se observó que esta indolamina ejercía una inhibición de la actividad aromatasa microsomal en el tejido tumoral mamario, neutralizando con ello la estimulación del crecimiento tumoral inducida por la testosterona [5,6, 49].

En relación con el mecanismo a través de cual la melatonina inhibe la expresión de la aromatasa en las células tumorales mamarias, se ha demostrado que implica la inhibición de la activación de los dos promotores responsables de la expresión de esta enzima en el tejido tumoral, los promotores pl.3 y pII, efecto que a su vez está mediado por la modulación que ejerce la melatonina sobre el AMPc, ya sea de forma directa mediante su unión al receptor MT₁ o de forma indirecta. Este segundo mecanismo indirecto se basa en la capacidad de la melatonina para inhibir la actividad y expresión de las ciclooxigenasas (COX-1 y sobre todo COX-2), reduciendo así la producción de PGE₂ en la célula, que en condiciones normales aumenta la expresión de la aromatasa a través del incremento en el nivel de AMPc. Esta reducción en la producción de PGE₂ supone una menor capacidad para incrementar los niveles de AMPc intracelulares y, por tanto, para conseguir la activación de los promotores de la aromatasa pII y pl.3, dando lugar a una expresión moderada del enzima que conduce a una menor biosíntesis de estrógenos en el tumor, lo que en último término impediría el crecimiento del mismo [3, 49]. Además, se ha evidenciado que, a través de su acción sobre el AMPc, la melatonina potencia la acción de otros compuestos antiaromatasa utilizados en el cáncer de mama como la aminoglutetimida [51].

Otro de los posibles mecanismos a través del cual la melatonina podría reducir la síntesis de estrógenos a nivel tumoral, es a través de la regulación que ejerce sobre la producción de citoquinas, tanto en las células inmunocompetentes como en las tumorales mamarias, ya que ha sido identificado el papel de algunas de ellas (IL-6, TNF- α , la oncostatina M, el factor inhibidor de la leucemia y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I) en la estimulación de la actividad aromatasa [3, 49].

Hasta ahora nos hemos centrado en los efectos de la melatonina sobre la actividad aromatasa en las células de cáncer de mama. No obstante, en los tumores mamarios la mayor parte de esta actividad se encuentra en el tejido adiposo, que está formado por los fibroblastos (90%) y por las células endoteliales (10%) del tejido vascular. La síntesis local de estrógenos depende por tanto de las interacciones paracrinias establecidas entre las células epiteliales malignas, y los fibroblastos y células endoteliales de los tejidos subyacentes.

A nivel tumoral, las células malignas secretan citocinas, tales como IL6, IL11, y TNF α , que inhiben la diferenciación de los fibroblastos peritumorales en adipocitos maduros a través de la inhibición de la expresión del PPAR γ y C/EBP α , dos de los principales reguladores de la diferenciación, estimulando además la actividad y expresión de la aromatasa en los fibroblastos indiferenciados. Este fenómeno conocido como reacción desmoplásica tumoral tiene como objetivo conseguir un ambiente rico en estrógenos en las inmediaciones del tumor gracias a una elevada expresión y actividad aromatasa, y es inhibido por la melatonina, que reduce la formación de fibroblastos indiferenciados, al aumentar la expresión de los factores de transcripción PPAR γ y C/EBP α e induce una regulación negativa de las citoquinas antiadipogénicas encaminada a reducir su actividad aromatasa [52]. La melatonina actúa además a otros niveles en el lecho tumoral, potenciando la acción de los principales mediadores de la adipogénesis y reduciendo la producción de PGE2 por las células malignas. Finalmente, a nivel tumoral, las células endoteliales expresan aromatasa, acción que es inhibida por la melatonina induciendo una regulación negativa sobre el promotor de la expresión de la aromatasa endotelial [3].

3.2. Acción anti-sulfatasa de la melatonina

La segunda vía involucrada en la producción de estrógenos en las células tumorales mamarias es la vía de la sulfatasa, que convierte estrógenos sulfatados en estrona y estradiol. Como ya se ha mencionado previamente, el sulfato de estrona es el precursor más importante del estradiol a nivel cuantitativo y la actividad de la estrógeno sulfatasa es superior a la actividad de la aromatasa a nivel tumoral, de ahí el interés de esta enzima como potencial diana terapéutica contra el cáncer [3].

En los últimos años, se ha demostrado que la melatonina a concentraciones fisiológicas (1 nM) reduce de forma significativa la actividad de la enzima sulfatasa, así como la expresión de su ARNm en las células MCF-7, conllevando este mecanismo a una disminución de la síntesis de estrógenos biológicamente activos a partir de formas inactivas y pudiendo ser el bloqueo de esta vía enzimática otra de las acciones antitumorales de la melatonina en el cáncer de mama dependiente de estrógenos. Este efecto inhibitorio de la sulfatasa es, además, compartido por otros compuestos, tales como algunos antiestrógenos sintéticos, como el tamoxifeno y sus derivados, algunos prostágenos, varios esteroides sintéticos, así como otros esteroides y compuestos no esteroides [49].

Esta modulación ejercida por la melatonina sobre la actividad sulfatasa, ha sido también descrita *in vivo*, en ratas con tumores inducidos químicamente con DMBA, en los cuales, mientras que la administración de sulfato de estrona es capaz de mantener el

crecimiento tumoral en roedores ovariectomizados al nivel de los animales control, la administración de melatonina contrarresta la actividad y expresión de este enzima y, por tanto, inhibe la conversión del sulfato de estrona en estrona que estimularía el desarrollo tumoral [53].

3.3. Acción inhibidora de la 17 β -Hidroxiesteroide Deshidrogenasa tipo 1

El último paso de la esteroidogénesis en los tejidos periféricos es la conversión de la estrona de baja actividad en un esteroide biológicamente más potente, el 17 β -estradiol, por la acción de la isoforma reductora de esta enzima, la 17 β -HSD1, habiendo una sobreexpresión de la misma en el cáncer de mama hormono-dependiente que favorece el crecimiento tumoral [3].

En esta línea, al igual que ocurre con la aromatasa y la sulfatasa, se ha descrito que la melatonina a concentración fisiológica, ejerce una inhibición de la actividad y expresión de la 17 β -HSD1 en las células tumorales mamarias, habiéndose objetivado esta modulación enzimática también en estudios *in vivo* llevados a cabo en roedores, evidenciándose una disminución significativa de la actividad de la 17 β -HSD1 en los testículos de ratas mantenidas en ciclos normales de luz y oscuridad tras la administración de melatonina [54].

Este efecto modulador sobre la acción de la 17 β hidroxiesteroide deshidrogenasa, es compartido por algunos antiestrógenos como el tamoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno o ICI-164384, los cuales ejercen una inhibición competitiva de los efectos de la 17 β -HSD1 en los tejidos tumorales mamarios [3].

3.4. Acción estimuladora sobre la estrógeno sulfotransferasa

En las células tumorales mamarias también está presente la estrógeno sulfotransferasa que convierte estrógenos en estrógenos sulfatados. Dado que los sulfoestrógenos son la forma biológicamente inactiva de los estrógenos, otra posible vía de control de la concentración local de estrógenos activos es buscar maneras de estimular los enzimas involucrados en la formación de sulfatos.

En esta línea, se ha demostrado que la melatonina a dosis fisiológicas es capaz de incrementar hasta 2 veces la actividad de la EST y hasta 3 veces su expresión en células MCF-7 [3].

3.5. Regulación de las enzimas implicadas en la producción local de estrógenos en tejido mamario sano y tumoral

Para resumir su actuación como SEEM, podemos concluir que la melatonina es capaz no solo de interactuar con la vía de señalización de los estrógenos, sino también de modular la biosíntesis intratumoral de estrógenos directamente a nivel de células tumorales mamarias, teniendo lugar la mayoría de las acciones ejercidas por la melatonina sobre las vías enzimáticas a dosis fisiológicas en el rango nanomolar, la misma concentración con la que la melatonina obtiene los mayores efectos antiproliferativos y antiinvasores.

Como ya se ha mencionado la principal diferencia entre el tejido tumoral y el tejido mamario normal, es que en el primero, la producción local de estrógenos se desplaza hacia la producción de estrona, ya que las altas concentraciones de esteroides inactivos circulantes, la androstenediona y los sulfatos de estrona, son los principales sustratos precursores de la producción local de estrógenos. Por el contrario, en el tejido tumoral mamario lo que predomina es la formación del 17β -estradiol activo, debido a que las células tumorales tienden a sobreexpresar aromatasa, sulfatasa y 17β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, lo que resulta en la acumulación de esta hormona en los alrededores del tumor.

Con respecto al papel de la melatonina como modulador SEEM, tal y como hemos comentado, se ha evidenciado que actúa disminuyendo la actividad y expresión de la aromatasa, la sulfatasa y la 17β -HSD1, incrementando la expresión de la EST (Fig. 16). Todo ello encaminado a ejercer un efecto protector a nivel del tejido mamario del exceso de estrógenos y asemejar la actividad y expresión enzimática a la propia del tejido sano [55].

Poco se conoce en la actualidad sobre los factores que regulan la expresión de la EST, 17β -HSD1 y la sulfotransferasa en humanos. Sin embargo, se ha evidenciado el papel crucial que ejercen las citoquinas (especialmente la interleuquina-6 y el factor de necrosis tumoral), los factores de crecimiento y la PGE_2 en la regulación de la síntesis de estrógenos en los tumores mamarios, siendo los macrófagos y los linfocitos, que invaden muchos tumores mamarios, una fuente importante de estos factores que favorecen la biosíntesis intratumoral de estrógenos. Por este motivo, los mecanismos propuestos para explicar la modulación que ejerce la melatonina sobre la actividad y expresión de la síntesis enzimática de estrógenos a nivel tumoral, se basan en la capacidad de esta indolamina para modular la producción de citoquinas y de PGE_2 en las células tumorales mamarias.

En conclusión, hasta donde se sabe, la melatonina es la única molécula que comparte propiedades de SERM y SEEM. Este doble mecanismo de acción, y la inhibición preferencial de $ER\alpha$, explica las propiedades oncostáticas de la melatonina en los tumores dependientes de estrógenos y confiere a la melatonina ventajas potenciales para el tratamiento de estas neoplasias.

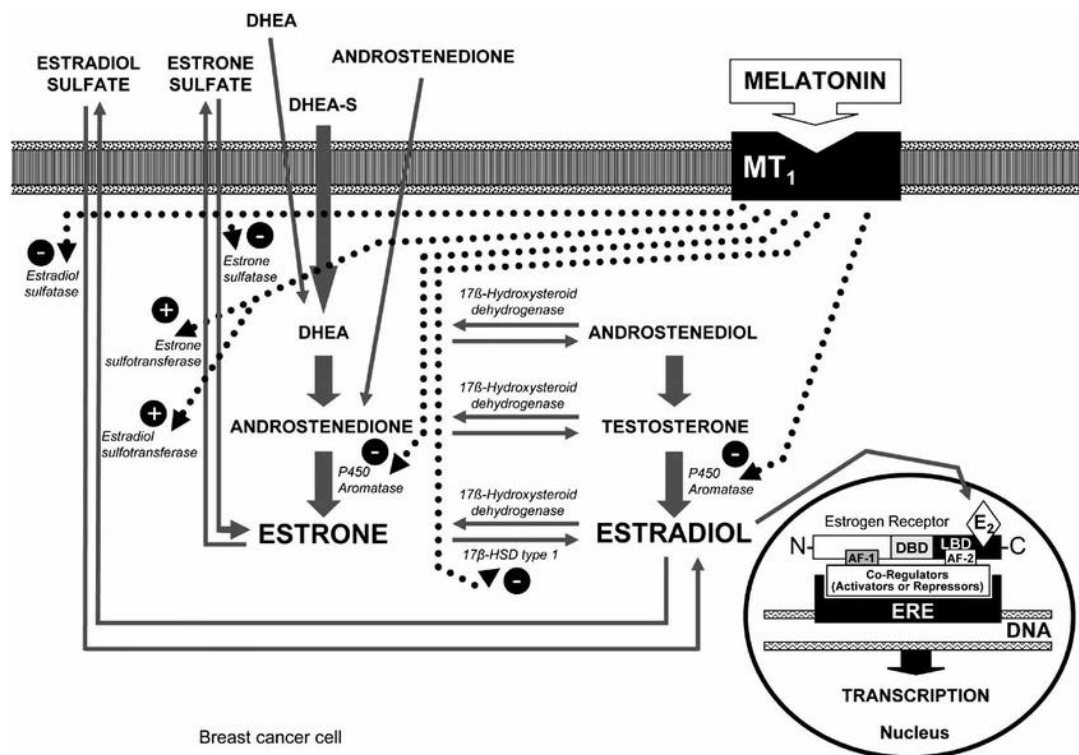


Figura 16. Sitios de acción de la melatonina actuando como SEEM en las células mamarias tumorales. (Cos et al. 2013) [7].

CONCLUSIONES

- La melatonina, constituye la principal hormona secretada por la glándula pineal, y se le han atribuido numerosas acciones, aunque en el hombre, su principal función es la sincronización de los ritmos circadianos con los fenómenos ambientales, fundamentalmente con la luz.
- Durante las últimas décadas ha aumentado el interés por esta indolamina, ya que gran cantidad de trabajos han descrito su potencial implicación en el desarrollo y prevención del cáncer, poniendo de manifiesto sus propiedades oncostáticas sobre una amplia variedad de tipos tumorales.
- Dentro de las acciones antitumorales de la melatonina, las acciones antiestrogénicas constituyen el sustrato fundamental de sus efectos oncostáticos sobre los tumores malignos mamarios hormono-dependientes. De este modo se ha demostrado que la melatonina actúa por dos mecanismos:
 - **Mecanismo indirecto**, regulando la síntesis de esteroides gonadales a través de una modulación negativa del eje neuroendocrino reproductor.
 - **Mecanismo directo**, ejercido a nivel del tejido tumoral, actuando la melatonina como un modulador selectivo de los receptores de estrógenos (SERM), así como un modulador selectivo de los enzimas estrogénicos (SEEM), modificando la actividad y la expresión de los enzimas involucrados en la síntesis local de estrógenos, llevándolos a niveles similares a los que hay en el tejido mamario normal.

La melatonina, a través de ambos mecanismos de acción, induce una disminución en los niveles de estrógenos gonadales y una neutralización de sus efectos sobre el tejido mamario, ejerciendo por tanto un efecto protector sobre el tejido tumoral de excesivos efectos estrogénicos y con ello siendo capaz de reducir el crecimiento de los tumores mamarios estrógeno-dependientes.
- Las propiedades oncostáticas de la melatonina y su capacidad de actuar a diferentes niveles de la vía de señalización estrogénica, hacen de ella una molécula con potencial preventivo y terapéutico en los tumores hormono-dependientes como el de mama.
- A pesar de que los ensayos clínicos realizados hasta la fecha sugieren que la melatonina es capaz de mejorar la calidad de vida de los pacientes oncológicos, alargar la supervivencia en ciertos pacientes con cáncer metastásico y disminuir o neutralizar los efectos adversos de la quimioterapia y radioterapia empleadas, gracias a sus efectos sensibilizantes a estos tratamientos, aún es limitada la aplicación de la melatonina en la práctica clínica diaria.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] World Health Organization (WHO). International Agency for Research on Cancer (IARC). *The Global Cancer Observatory*, 2018 statistics.
- [2] World Health Organization (WHO). Breast cancer: prevention and control (2020).
- [3] Cos S, González A, Alvarez-García V, Alonso-González A, Martínez-Campa. Melatonin and Breast Cancer: Selective Estrogen Enzyme Modulator Actions. *Advances in Cancer Drug Targets* 2013; Vol 1: 207-237.
- [4] Howell A, Clarke RB, Anderson E. Oestrogens, Beatson and endocrine therapy. *Endocr. Relat. Cancer* 1997; 4: 371-380.
- [5] Cos S, González A, Martínez-Campa C, Mediavilla M.D, Alonso-González C, Sánchez Barceló E.J. Estrogen-signaling pathway: A link between breast cancer and melatonin oncostatic actions. Elsevier. *Cancer Detect. Prev.* 2006; 30: 118-128.
- [6] Sánchez-Barceló EJ, Cos S, Mediavilla D, Martínez-Campa C, González A and Alonso-González C. Melatonin–estrogen interactions in breast cancer. *J. Pineal Res.* 2005; 38: 217–222.
- [7] Yue W, Wang JP, Hamilton CJ, Deers LM, Santen RJ. In situ aromatization enhances breast tumor estradiol levels and cellular proliferation. *Cancer Res.* 1998; 58: 927-932.
- [8] Cardinali DP, Jordá Catalá JJ, Sánchez-Barceló EJ. Introducción a la cronobiología: fisiología de los ritmos biológicos. *Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cantabria 1994, Caja Cantabria.*
- [9] Amaral FGD, Cipolla-Neto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab.* 2018; 62(4): 472-479.
- [10] Venegas Maldonado CJ. Estudio de los mecanismos de regulación de la síntesis, distribución y efectos de la melatonina extrapineal. *Universidad de Granada* 2012.
- [11] Lobato Poncela A. La melatonina más allá del ritmo circadiano. *UVAdoc* 2015.
- [12] Liu T, Borjigin J. Free-running rhythms of pineal circadian output. *J. Biol. Rhythms* 2005; 20(5): 430-40.
- [13] Kelleher FC, Rao A, Maguire A. Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer Lett.* 2014; 342(1): 9-18.
- [14] Hill SM, Belancio VP, Dauchy RT, Xiang S, Brimer S, Mao L., Hauch A, Lundbnerg PW, Summers W, Yuan L, Frasch T, Blask D.E. Melatonin: an inhibitor of breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 2015; 22(3): R183-R204.
- [15] González Urbistondo F. Papel de la melatonina en los procesos tumorales. *TFG, Universidad de Cantabria*, 2019.

- [16] Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N., Fougere C. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Curr. Neuropharmacol.* 2017; 15(3): 434-443.
- [17] Acuña Castroviejo D, Escames G. Síntesis y metabolismo de la melatonina. *IIMEL* 2017.
- [18] Cipolla-Neto J1, Amaral FGD. Melatonin as a Hormone: New Physiological and Clinical Insights. *Endocr. Rev.* 2018; 39(6):990-1028.
- [19] Cardinali DP. Melatonina: Fisiología y Aplicaciones Clínicas. *VERTEX Rev. Arg. Psiquiat.* 2007; 18: 288-293.
- [20] Carrillo-Vico A, Reiter RJ, Lardone PJ, Herrera JL, Fernández-Montesino R, Guerrero JM, Pozo D. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr. Opin. Invest. Dr.* 2006; 7(5): 423.
- [21] Benitez-King G, Huerto-Delgadill L, Anton-Tay F. Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 1993; 53(3): 201-207.
- [22] Del Rio B, García Pedrero JM., Martínez-Campa C, Zuazua P, Laso PS, Ramos S. Melatonin, an endogenous-specific inhibitor of estrogen receptor alpha via calmodulin. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(37): 38294-38302
- [23] Macias M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuña-Castroviejo D. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur. J. Biochem.* 2003; 270 (5): 832-840.
- [24] Cardinali, DP, Freire F. Melatonin effects on brain. Interaction with microtubule protein, inhibition of fast axoplasmic flow and induction of crystalloid and tubular formations in the hypothalamus. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1975; 2(5): 317-330.
- [25] Acuña Castroviejo D, Escames G. Mecanismos de acción de la melatonina. *IIMEL* 2017.
- [26] Acuna-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, Reiter R J. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J. Pineal Res.* 2001; 30 (2): 65-74.
- [27] Turek FW, Gillette MU. Melatonin, sleep, and circadian rhythms: rationale for development of specific melatonin agonists. *Sleep Med.* 2004; 5(6): 523-32.
- [28] Cajochen C, Kräuchi K, Wirz-Justice A. Role of melatonin in the regulation of human circadian rhythms and sleep. *J. Neuroendocrinol.* 2003; 15(4): 432-7.
- [29] Carrillo-Vico A, Patricia JL, Álvarez-Sánchez N, Rodríguez-Rodríguez A, Guerrero JM. Melatonin: Buffering the Immune System. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14(4): 8638–8683.
- [30] Chuffa LGA, Fioruci BA, Seiva F. Melatonin and their protective role on oxidative cell damage: interplay between oxidative stress and tumorigenesis. *New Developments in Melatonin Research* 2013 (pp. 121-138).

- [31] Vanecek J. Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol. Rev.* 1998; 78(3): 687-721.
- [32] Mediavilla MD, Sánchez-Barceló EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. *Curr. Med. Chem.* 2010; 17: 4462-4481.
- [33] Cos S, Gonzalez A, Güezmes A, Mediavilla MD, Martinez-Campa C, Alonso-Gonzalez C, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin inhibits the growth of DMBA-induced mammary tumors by decreasing the local biosynthesis of estrogens through the modulation of aromatase activity. *Int. J. Cancer* 2006; 118: 274-278.
- [34] Karbownik M, Lewinski A, Reiter RJ. Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2001; 33: 735-753.
- [35] Kovacs EJ, Messingham KAN, Gregory MS. Estrogen regulation of immune responses after injury. *Mol. Cell Endocrinol.* 2002; 193: 129-135
- [36] Leon-Blanco MM, Guerrero JM, Reiter RJ, Calvo JR, Pozo D. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *J. Pineal Res.* 2003; 35: 204-211.
- [37] Proietti S, Cucina A, Reiter RJ, Bizzarri M. Molecular mechanisms of melatonin's inhibitory actions on breast cancers. *Cell. Mol. Life Sci.* 2013; 70(12): 2139-2157.
- [38] Cos S, Sánchez Barceló EJ. Melatonin and mammary pathological growth. *Front. Neuroendocrinol.* 2000; 21: 133-170.
- [39] Cohen M, Lippman M, Chabner B. Role of pineal gland in etiology and treatment of breast cancer. *Lancet* 1978; 2: 814-816.
- [40] Tamarkin L, Danforth DN, Lichter A, Demoss E, Cohen M, Chabner B, Lippman M. Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. *Science* 1982; 216: 1003-1005.
- [41] Cos S, Mediavilla MD, Martinez-Campa C, González A, Alonso-Gómez C, Sánchez-Barceló EJ. Exposure to light at night increases the growth of DMBA-induced mammary adenocarcinomas in rats. *Cancer Lett.* 2006; 235: 266-271.
- [42] Blask DE, Brainard GC, Dauchy RT, Hanifin JP, Davidson LK, Krause JA, Sauer LA, Rivera-Bermudez MA, Dubocovich ML, Jasser SA, Lynch DT, Rollag MD, Zalatan F. Melatonin-depleted blood from premenopausal women exposed to light at night stimulates growth of human breast cancer xenografts in nude rats. *Cancer Res.* 2005; 65: 11174-11184.
- [43] Cos S, Sánchez Barceló EJ. Melatonin, experimental basis for a possible application in breast cancer prevention and treatment. *Histol. Histopathol.* 2000; 15: 663-647.

- [44] Mediavilla MD, Cos S, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin increases p53 and p21waf1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Life Sci.* 1996; 58: 881-886.
- [45] Cos S, Fernández R, Güezmes A, Sánchez-Barceló EJ. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res.* 1998; 58: 4383-4390.
- [46] Sanchez-Barcelo EJ, Mediavilla MD, Alonso-Gonzalez C, Rueda N. Breast cancer therapy based on melatonin. *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune. Drug. Discov.* 2012; 6(2): 108-116.
- [47] Sánchez-Barceló EJ, Cos S, Fernández R, Mediavilla MD. Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr. Relat. Cancer* 2003; 10: 153-159.
- [48] Cos S, Martinez-Campa C, Gonzalez A, Alvarez-Garcia V, Alonso-Gonzalez C. Melatonin and Aromatase in Breast Cancer. *Clin. Cancer Drugs* 2014; 1: 54-64.
- [49] González A, Cos S, Martinez-Campa C, Alonso-Gonzalez C, Sanchez-Mateos S, Mediavilla MD, Sanchez-Barcelo EJ. Selective estrogen enzyme modulator (SEEM) actions of melatonin in human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* 2008; 45: 86-92.
- [50] González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Mateos S, Hill SM, Sánchez-Barceló EJ, Cos S. Effects of MT₁ melatonin receptor overexpression on the aromatase-suppressive effects of melatonin in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncol. Rep.* 2007; 17: 947-955.
- [51] Martínez-Campa C, González A, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez Barceló EJ, Cos S. Melatonin enhances the inhibitory effect of aminoglutethimide on aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 2005; 94: 249-254.
- [52] Alvarez-García V, González A, Alonso-González C, Martinez-Campa C, Cos S. Melatonin interferes in the desmoplastic reaction in breast cancer by regulating cytokine production. *J Pineal Res.* 2012; 52: 282-290.
- [53] González A, Álvarez-García V, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Barceló EJ, Cos S. *In vivo* inhibition of the estrogen sulfatase enzyme growth of DMBA-induced mammary tumors by melatonin. *Curr. Cancer Drug Tar.* 2010; 10: 279-286.
- [54] Maitra SK, Ray AK. Role of light in the mediation of acute effects of a single afternoon melatonin injection on steroidogenic activity if tests in the rat. *J. Biosci.* 2000; 25: 253-256.
- [55] Cos S, Martinez-Campa C, Mediavilla MD, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin modulates aromatase activity in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Pineal Res.* 2005.